UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II
Unités d'Enseignement et de Recherche
des Sciences pharmaceutiques

Année - 1971 - Thèse N° 611

Application de la Chromatographie en Phase Gazeuse à l'Identification et au Dosage des Barbituriques dans le sang

Thèse pour le Doctorat de l'Université
(Mention Pharmacie)
présentée et soutenue publiquement
le 28 Avril 1971

par Yvan CLERC
Pharmacien Chimiste des Armées
Interne des Hôpitaux de Bordeaux
né le 7 Mars 1947 à DIJON (Côte-d'Or)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. R. CASTAGNOU, Professeur . . . . . Président

M. E. NEUZIL, Professeur . . . . . }
M. G. NEVERRE, Professeur . . . . . } Juges
Mlle S. LARCEBAU, Professeur . . . . . }

Éditions Bergeret, 2, rue Bergeret - BORDEAUX
— Tél. 91-12-59 —

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543911_0046

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II
Unités d'Enseignement et de Recherche
des Sciences pharmaceutiques

Année - 1971 - Thèse N° 614

Application de la Chromatographie en Phase Gazeuse à l'Identification et au Dosage des Barbituriques dans le sang

Thèse pour le Doctorat de l'Université
(Mention Pharmacie)
présentée et soutenue publiquement
le 28 Avril 1971

par Yvan CLERC
Pharmacien Chimiste des Armées
Interne des Hôpitaux de Bordeaux
né le 7 Mars 1947 à DIJON (Côte-d'Or)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. R. CASTAGNOU, Professeur . . . . . Président

M. E. NEUZIL, Professeur . . . . . } Juges
M. G. NEVERRE, Professeur . . . . . }
Mlle S. LARCEBAU, Professeur . . . . . }

Éditions Bergeret, 2, rue Bergeret - BORDEAUX
— Tél. 91-12-59 —

A LA MEMOIRE DE MES GRANDS-PARENTS

A MES PARENTS

Vous avez éveillé mon goût pour les sciences. Soyez assurés de ma gratitude et de mon amour filial.

A MA TENDRE FIANCEE

A MES SOEURS

A TOUTE MA FAMILLE

A TOUS MES CAMARADES DE L'INTERNAT EN PHARMACIE

A TOUS MES AMIS DE L'ECOLE PRINCIPALE
DU SERVICE DE SANTE DE LA MARINE

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A Mademoiselle Martine MARGERIT

Votre souriante collaboration nous a été précieuse et nous a aidé grandement en nous évitant souvent des tâches ingrates.

A Mademoiselle Bernadette GEORGEAULT

A Mademoiselle M. LAFERRERE

A Madame G. FERMÉ

Vous m'avez toujours donné l'exemple d'un travail accompli avec une très grande conscience et une parfaite compétence.

A TOUS LE PERSONNEL

du Centre de Réanimation respiratoire

de l'Hôpital des Enfants

A Monsieur D. MICHON

Interne en Pharmacie

Tu as été mon prédécesseur au poste d'Interne au Laboratoire d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire. J'ai pu ainsi bénéficier des résultats que tu avais déjà obtenus dans le domaine de la chromatographie en phase gazeuse appliquée à l'identification des barbituriques.

En témoignage de ma reconnaissance et de mon amitié.

A Mademoiselle le Docteur L. FERRUS

Attaché de Recherche de l'I.N.S.E.R.M.
C.E.S. de Médecine du Travail

Nous avons largement abusé de votre aide. Au cours de l'élaboration de ce travail, votre compétence nous a été précieuse. Vous nous avez ainsi grandement facilité le travail bibliographique.

Veuillez accepter ce gage de notre reconnaissance.

A Madame le Docteur A. BRACHET-LIERMAIN

Chef de Travaux d'Anesthésiologie
Biologiste Assistant des Hôpitaux
Chevalier des Palmes académiques

Vous avez guidé nos débuts en chromatographie pratique et cette thèse est la vôtre bien plus que la mienne. Vous en avez proposé le sujet et, pas à pas, vous en avez suivi l'élaboration. J'ai pu ainsi, en bénéficiant de votre haute culture scientifique et grâce à votre enthousiasme pour la Recherche, mener à sa fin ce travail de Toxicologie Clinique.

Veuillez trouver ici le témoignage sincère de ma profonde admiration.

A Monsieur le Professeur R. CASTAING

Professeur de Réanimation respiratoire
et Anesthésiologie
Médecin des Hôpitaux, Chef de Service
Chevalier des Palmes académiques
Chevalier de l'Ordre du Mérite

Sous votre direction, le Centre de Réanimation et le Laboratoire d'Exploration Fonctionnelle respiratoire réalisent un ensemble dynamique où règne un esprit d'équipe exemplaire.

Votre intérêt pour les problèmes du Laboratoire nous a été d'une aide considérable au cours de la réalisation de ce travail.

Veuillez trouver ici l'expression de notre profond respect.

A MONSIEUR LE MEDECIN GENERAL DE 2ème CLASSE N U N

Spécialiste des Hôpitaux des Armées
Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier de l'Ordre National du Mérite
Croix de Guerre 1939-1945
Directeur de l'Ecole Principale
du Service de Santé de la Marine

A MONSIEUR LE MEDECIN EN CHEF DE 1ère CLASSE LESTAGE

Chevalier de la Légion d'Honneur
Sous-Directeur de l'Ecole Principale
du Service de Santé de la Marine

A NOS JUGES

Mademoiselle le Professeur S. LARCEBAU

Professeur sans Chaire de Toxicologie
Licenciée ès-Sciences
Chevalier des Palmes académiques

Vous nous faites l'honneur de participer à notre jury de thèse. Nous vous adressons notre respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur G. NEVERRE

Professeur sans Chaire (Physiologie)
Biologiste des Hôpitaux (Exploration fonctionnelle)
Chevalier de la Légion d'Honneur
Croix de Guerre 1939-1945
Chevalier des Palmes académiques

Nous avons quotidiennement bénéficié de votre grande expérience dans le domaine de la recherche.

Vous nous avez prodigué vos conseils pour la rédaction de ce travail et vous avez eu l'amabilité de nous aider dans son illustration.

Veuillez trouver ici la marque de notre profonde et respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur E. NEUZIL

Professeur de Biochimie médicale "B"
Médecin Biologiste des Hôpitaux, Chef de Service
Docteur ès-Sciences
Officier des Palmes académiques
Officier du Mérite Sénégalais

Nous vous remercions d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail. Nous vous assurons de notre profond respect.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur R. CASTAGNOU

Professeur de Toxicologie et Hygiène appliquée
Pharmacien des Hôpitaux psychiatriques
Membre de l'Académie de Pharmacie
Chevalier de l'Ordre national du Mérite
Officier des Palmes académiques

Nous avons bénéficié de votre lumineux enseignement au cours de nos études pharmaceutiques.
Vous nous faites aujourd'hui le grand honneur de bien vouloir accepter la présidence du Jury de notre Thèse de Doctorat.

Veuillez accepter l'hommage de nos sentiments très respectueux de vive reconnaissance.

APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE A L'IDENTIFICATION ET AU DOSAGE DES BARBITURIQUES DANS LE SANG

INTRODUCTION

L'analyse de l'activité d'un Centre de Réanimation met en évidence le nombre croissant des intoxications de toutes natures et la fréquence particulière des empoisonnements médicamenteux volontaires que traite un tel service hospitalier . Ainsi, depuis le 1er janvier 1958, le Centre de Réanimation Respiratoire de Bordeaux (CRR) a reçu 3268 cas d'intoxications dont 574 pour la seule année 1969 et 616 pour l'année 1970 à la date du 30 novembre .

L'étude de leur répartition par année, illustrée par l'histogramme ci-dessous (figure n°1) nous permet de constater la fréquence croissante des intoxications globales s'accompagnant d'une prédominance nette de celles dues aux barbituriques . Celles-ci atteignent un taux maximum de 60% en 1964 par rapport à celui des intoxications globales pour décroître les années suivantes (tableau I) . Cette diminution n'est qu'apparente car les barbituriques accusent une progression régulière en valeur absolue . Ce phénomène s'explique en réalité par l'augmentation concomitante d'intoxications d'origine médicamenteuse autre que barbiturique .

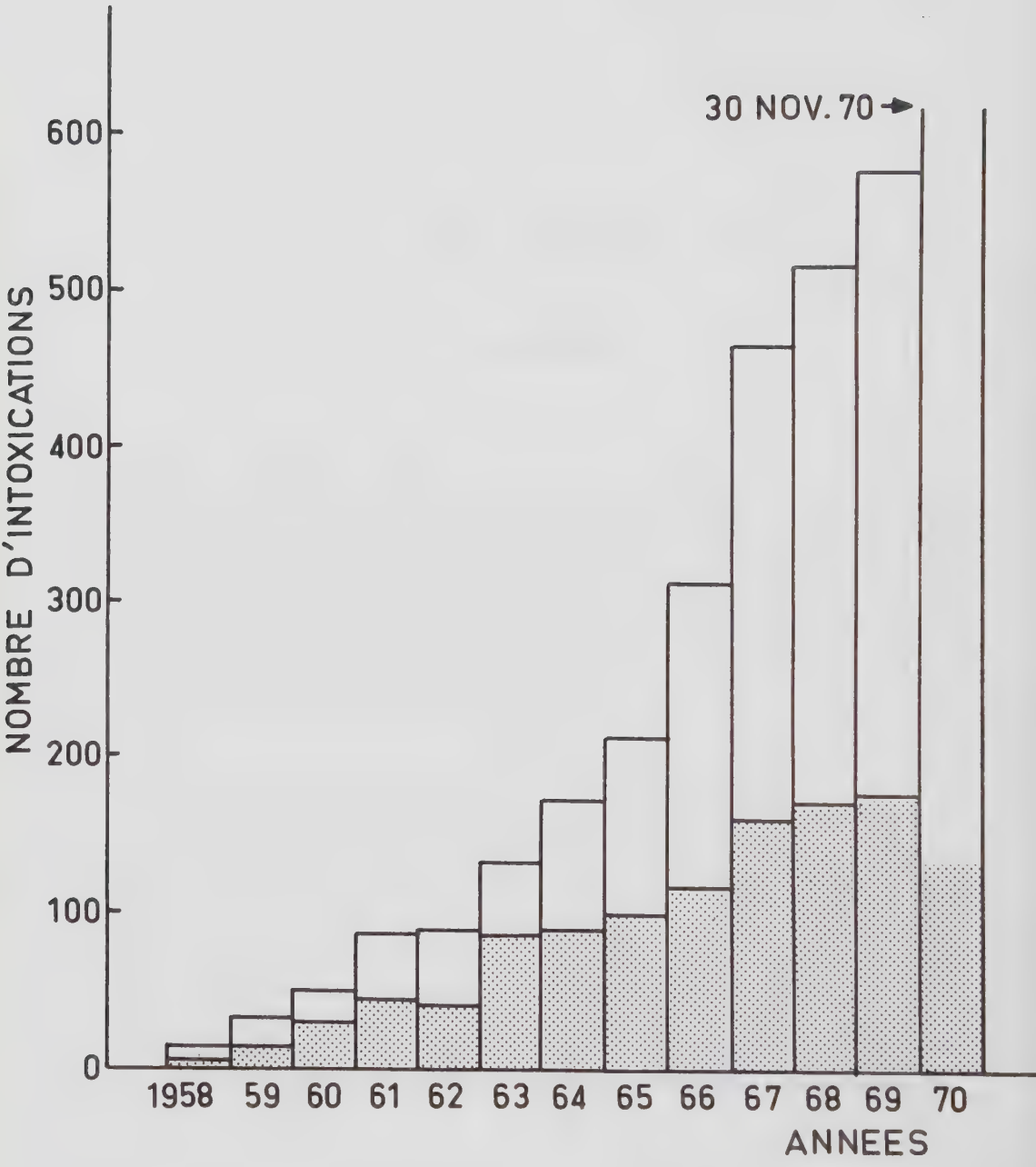


FIGURE 1

Histogramme de la répartition par année des cas d'intoxications traités au C.R.R. de Bordeaux du 1er Janvier 1958 au 30 Novembre 1970. Les intoxications barbituriques sont figurées en grisé.

ANNEE	Nombre global de cas d'intoxications hospitalisés	Nombre d'intoxications barbituriques			Intoxications barbituriques %
		barbituriques seuls (1)	barbituriques + autres drogues	TOTAL	
1958	17	6	2	8	47
1959	37	14	3	17	45,9
1960	50	22	11	33	66
1961	86	33	15	48	55,8
1962	87	31	7	38	43,6
1963	131	53	26	79	60,3
1964	172	54	41	95	55,2
1965	210	50	39	89	42,3
1966	310	72	39	111	35,8
1967	462	102	58	160	34,6
1968	516	92	77	169	32,7
1969	574	112	65	177	30,8
1970 (2)	616	74	61	135	21,9

(1) Un ou plusieurs barbituriques. (2) Période du 1.1.70 au 30.11.70.

Tableau I

Les cas d'intoxications traités au C.R.R. de Bordeaux de 1958 à 1970
Pourcentages par année des intoxications barbituriques

La fréquence de ces autres toxiques est mise en évidence sur le tableau II qui montre surtout l'importance des intoxications dues aux benzodiazépines, aux imipramines et à l'amitryptiline . Pour les médicaments les plus représentatifs, nous avons calculé le pourcentage d'augmentation en 1970 par rapport à l'année précédente. Ainsi l' Anafranil montre la progression la plus forte (environ 300%) suivi du Valium, du Seresta, du Tofranil, du Mandrax et de l'Insidon, dont le pourcentage d'augmentation varie de 80 à 130%, viennent ensuite l' amitryptiline et le Tranxène avec 50% .

Les difficultés devant lesquelles on se trouve pour obtenir des renseignements précis concernant la nature des produits absorbés (état comateux ou semi-comateux du malade, ignorance ou enquête insuffisante de la part de l'entourage) font qu'un dépistage toxicologique rapide est nécessaire pour orienter le diagnostic .

Mais si dans la pratique courante on peut se contenter, pour un grand nombre d'intoxications mineures, d'un diagnostic qualitatif, il devient indispensable pour les formes cliniques graves, d'établir aussi rapidement que possible un bilan non seulement qualitatif, mais aussi quantitatif . Les éléments de pronostic fournis par une identification et un dosage prompts doivent permettre d'aligner l'importance de la thérapeutique sur la gravité de l'intoxication . SCHREINER (36) propose de recourir à l'épuration extra-rénale après l'absorption de 3 grammes de barbiturique à action brève ou de 5 grammes de barbiturique à effet prolongé .

Produits	*1969*	*1970*	*Produits*	*1969*	*1970*
Barbituriques	177	135	Insidon	6	11
Valium	49	99	Théralène	6	7
Oxyde de Carbone	43	27	Pertofran	5	1
Equanil	35	28	Mérinax	4	0
Salicylés	28	25	Surmontil	3	4
Mogadon	19	19	Trichloréthylène	3	2
Nozinan	19	21	Quinine-Nivaquine	2	3
Amitryptiline	19	29	Moditen	2	0
Librium	15	18	Tégretol	1	0
Mépronizine	15	17	Doridène	1	1
Tofranil	11	20			
Largactil	10	12	Taractan	1	0
Phénergan	9	3	Neuleptil	1	0
Seresta	8	18	Nobrium	0	9
Tranxène	7	11	Alimérazine	0	2
Anafranil	7	27	Majeptil	0	0
Melleril	7	6	N. Oblivon	0	0
Mandrax	7	16	Dogmatil	0	0

Tableau II

Répartition des produits responsables des cas d'intoxications traités au C.R.R. de Bordeaux en 1969 et 1970

Il est bien évident que dans ces cas l'identification et le dosage rapide du barbiturique peuvent représenter un des éléments de base de la thérapeutique .

C'est dans cette perspective que nous nous sommes appliqué à étudier la place que la chromatographie en phase gazeuse pouvait occuper dans le diagnostic de toxicologie clinique .

PREMIERE PARTIE

L' ANALYSE DES BARBITURIQUES

PRINCIPES GENERAUX ET METHODES

CHAPITRE I

PRINCIPES GENERAUX D'IDENTIFICATION ET DE DOSAGE DES BARBITURIQUES DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES

Nous allons brièvement résumer les différentes méthodes d'extraction, de purification, d'identification et de dosage des barbituriques en ne considérant tout d'abord que les techniques qui ne font pas appel à la chromatographie en phase gazeuse . Nous empruntons ces données au chapitre important que consacre CASTAGNOU (18) à ces dérivés dans le "Traité de Biologie Appliquée" de OLIVIER, ainsi qu'à l'article de SUNSHINE (55) "An evaluation of methods for the determination of barbiturates in biological materials", où l'on trouvera un grand nombre de références bibliographiques .

I - EXTRACTION DES BARBITURIQUES DES LIQUIDES BIOLOGIQUES .

Cette extraction doit être quantitative et, dans la mesure du possible, sélective ou suivie d'une purification appropriée de l'extrait .

La mobilité des hydrogènes liés aux deux atomes d'azote confère un caractère acide à la molécule de barbiturique dont l'ionisation est fonction du pH . Pour une valeur du pH inférieure à 8, l'ionisation est pratiquement nulle . Le barbiturique est alors insoluble dans l'eau mais soluble dans les solvants organiques . La plupart des auteurs préconisent une acidification nette du liquide biologique à analyser . Certains conseillent l'addition d'un acide fort (HCl) , d'autres, fixant la valeur du pH à obtenir, ajoutent une solution tampon qui, souvent, est constituée par une solution saturée de phosphate monosodique . D'autres enfin, lorsqu'il s'agit de sang frais dont le pH est de l'ordre de 7,4 n'acidifient pas et font agir directement le solvant .

Différents solvants organiques ont été utilisés. Le chloroforme et l'éther sont le plus fréquemment retenus, mais le premier a l'inconvénient de donner souvent des émulsions et le second de retenir une quantité d'eau assez importante . Le dichlorométhane est le meilleur solvant, mais il demande un volume 50 fois supérieur à celui de la phase aqueuse à extraire . L'éther dibutylique et l'acétate d'éthyle ont également été proposés, notamment dans le cas particulier où l'on souhaite extraire les métabolites .

II - PURIFICATION .

Le résidu d'évaporation du solvant organique contient, outre les barbituriques, certains constituants normaux des liquides biologiques, des métabolites des barbituriques et éventuellement d'autres médicaments absorbés à dose thérapeutique ou toxique ou encore des substances d'origine non médicamenteuse . Une élimination de ces composés est souvent indispensable . On a alors recours à plusieurs procédés qui précèdent ou suivent l'extraction .

1°- Défécation .

Dans le cas du sang, la défécation sulfotungstique est le procédé de choix . La quantité d'acide sulfurique doit être supérieure à celle que l'on utilise généralement, de manière à obtenir un filtrat nettement acide . C'est en particulier le procédé retenu par SCHNEIDER dans la thèse consacrée au dosage des barbituriques par la méthode spectrophotométrique (47) .

2°- Déshydratation .

La fraction organique dissout de l'eau qui contient des impuretés . Pour les éliminer, il suffit de déshydrater par le sulfate de soude anhydre .

3°- Lavage de la phase organique .

L'agitation avec une solution de phosphate tamponnée à pH 7, 40 élimine les substances plus acides que les barbituriques et en particulier les dérivés salicylés .

4°- Extraction des barbituriques par une solution aqueuse alcaline .

Les dérivés neutres restent en phase organique et les solutions salines de barbituriques sont alors suffisamment purifiées pour être dosées par spectrophotométrie ultra-violette . La solution aqueuse peut également être acidifiée et extraite par un solvant organique dont l'évaporation donnera un résidu purifié de barbituriques .

5°- Action de certains charbons activés ou de résines .

Certains de ces charbons n'absorbent pas les barbituriques, de même certaines résines du type Florisil.

III - IDENTIFICATION ET DOSAGE .

De nombreuses techniques ont été proposées, témoignant des difficultés rencontrées, surtout lorsqu'il s'agit d'une identification rapide et précise .

1°- Identification fondée sur les propriétés acides de la molécule barbiturique .

Tous les acides organiques faibles qui sont susceptibles de libérer des ions H^+ présentent une absorption dans l'UV. Les barbituriques n'échappent pas à la règle et on note deux maxima d'absorption à 238 et 265 nm, respectivement pour les pH 10 et 13 correspondant à l'ionisation d'un, puis de deux groupements NH . Cette propriété est mise à profit dans l'analyse quantitative des barbituriques, mais elle a le grave inconvénient de n'être pas spécifique . La méthode différentielle de BOURDON et coll. (10) élimine les erreurs dues à d'autres substances absorbant également dans l'UV.

2°- Identification liée à la présence du groupement -CO-NH-CO .

Il confère à la molécule la propriété de donner des complexes colorés ou insolubles . Cette propriété n'est évidemment pas spécifique des barbituriques, elle est partagée avec les molécules du type hydantoïne, phtalimide . . .

a) Formation de complexes colorés

- avec les ions Co^{+++} : en milieu alcoolique, alcalin et rigoureusement anhydre, les barbituriques donnent un

complexe aminé fortement coloré . La réaction de Parri est basée sur cette propriété, mais elle n'est pas très sensible .

- avec les ions Cu^{++} , Ag^{+} et dans certaines conditions, les barbituriques donnent également des dérivés colorés.

b) Formation de complexes insolubles .

- avec les ions de métaux lourds comme Ag^{+}, Hg^{++} , Cu^{++} , les dérivés de la malonylurée donnent des complexes insolubles . Dans les complexes mercuriels , le mercure peut être mis en évidence par la diphénylcarbazone . La formation de ces complexes peut servir à l'identification des barbituriques séparés au préalable par une chromatographie sur papier ou en couche mince, qui permettra un dosage semi-quantitatif .

- avec le xanthydrol on obtient également des complexes insolubles et cristallisés dont le point de fusion est caractéristique . Mais la méthode nécessite de trop gros volumes d'échantillons pour être utilisée en pratique .

3°- Identification fondée sur les caractères microcristallins .

Ces caractères seront comparés à ceux d'échantillons témoins .

4°- Identification par la chromatographie sur papier ou en couche mince.

Elle est fondée sur les valeurs des constantes de migration que l'on compare à celles d'échantillons témoins .

Ce sont ces techniques qui prévalent à l'heure actuelle . On trouvera à ce sujet des renseignements pratiques et bibliographiques nombreux dans l'ouvrage de CLARKE "Isolation and identification of drugs" (20) .

Différents éluants ont été proposés. La révélation des spots obtenus est fondée sur l'utilisation d'une ou plusieurs propriétés physicochimiques énoncées plus haut (absorption UV, formation de complexes colorés)ou de propriétés liées à l'existence de groupements particuliers (substituants insaturés, groupement réducteur . . .).

Il semble nécessaire, pour obtenir une identification rigoureuse de procéder à plusieurs migrations simultanées avec des solvants ou des mélanges de solvants appropriés . La chromatographie sur papier ou sur plaque ne permet pas un dosage suffisamment précis ; on devra utiliser alors une technique différente, la plus courante demeurant la spectrophotométrie ultraviolette .

5°- Identification par la Chromatographie en Phase Gazeuse .

Depuis quelques années, la chromatographie en phase gazeuse conquiert progressivement le domaine de la biologie clinique et de la toxicologie . Un certain nombre d'auteurs étrangers se sont déjà intéressés au problème de l'identification et du dosage simultané des barbituriques dans les milieux biologiques au moyen de cette technique . Ce sont ces recherches que nous allons énumérer dans le chapitre suivant .

CHAPITRE II

APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE A L'IDENTIFICATION ET AU DOSAGE DES BARBITURIQUES

La première publication relative à l'identification des barbituriques par chromatographie en phase gazeuse date de 1960. Elle est due à JANAK (30) qui étudie, par ce procédé, les produits de pyrolyse des sels de sodium de ces dérivés .

- En 1961 : BROCHMANN-HANSSEN et SVENDSEN (13), dans une communication, présentent les premiers résultats relatifs à l'étude de la séparation de 21 barbituriques sur colonne d'Apiezon L. Ils envisagent la possibilité d'utiliser cette technique pour la mise en évidence de ces dérivés dans les liquides biologiques.

PARKER et KIRK (41) utilisent une colonne de verre remplie de SE 30 et déterminent les temps de rétention de 23 barbituriques .

COOK, RILEY, NUNN et BUDGEN (21), afin d'obtenir une meilleure résolution des pics, transforment les barbituriques en leurs dérivés méthylés par action du diazométhane . Ces auteurs ont recours à deux colonnes , l'une remplie d'apiezon, l'autre d'adipate de polyéthylène glycol .

- En 1962 :

BROCHMANN-HANSSEN et SVENDSEN (14), poursuivant leurs premiers travaux de 1961, comparent les chromatogrammes obtenus à partir de 23 barbituriques en solution pure sur colonnes SE 30, SE 52, Apiezon L , NGSE, PEG 4000 et QF1, dans différentes conditions de température . Ils insistent sur la nécessité d'utiliser 2 colonnes pour obtenir une séparation de tous les barbituriques . Leur choix se porte sur l'Apiezon L phase apolaire et la PEG , phase légèrement polaire .

La même année SVENDSEN et BROCHMANN-HANSSEN (56) complètent ces résultats par une étude de l'élimination urinaire des métabolites du barbital, du méthar - bital, du phénobarbital, du méphobarbital et de l'aprobarbital en utilisant une colonne de NGS . Pour séparer le phénobarbital de son dérivé parahydroxylé, ils utilisent une colonne d' Apiezon L .

VANDENHEUVEL , HAAHTI, et HORNING (59) effectuent des travaux similaires aux précédents avec les phases suivantes : SE 30, QF 1 et NGS .

- En 1963 :

CIEPLINSKI (19) observant le "tailing" de certains pics de barbituriques, réussit à améliorer la qualité de ces pics en traitant le support solide soit avec un acide dimère en C 36, soit un acide trimère en C 54, avant d'appliquer la phase liquide .

KAZYAK et KNOBLOCK (32) tentent une application de la technique de chromatographie en phase gazeuse à la recherche d'un grand nombre de substances médicamenteuses, barbituriques notamment,éliminées dans l'urine . Après une première séparation basée sur les solubilités différentes en fonction du pH, les extraits sont chromatographiés sur colonne SE 30 et QF 1 et les indices de rétention comparés . Les auteurs insistent sur la nécessité d'utiliser deux phases stationnaires de polarité différente pour parvenir à une résolution satisfaisante des pics .

FURANO et GREENE (23) utilisant comme phase stationnaire du NAT mettent en évidence dans le sang des malades anesthésiés au pentothal du phénobarbital . En réalité l'oxydation du barbiturique initial est réalisée au cours de son extraction par le chloroforme .

PARKER, FONTAN et KIRK (41-42-43) étudient les résultats obtenus avec une phase apolaire , SE 30 et une phase polaire Carbowax 20 M . La plupart des barbituriques sont ainsi élués .

- En 1964 :

JAIN, FONTAN, KIRK (27) travaillant sur colonne de SE 30 et de Carbowax 20 M s'efforcent d'améliorer la sensibilité de détection afin de pouvoir utiliser des volumes d'échantillons sanguins réduits (50 à 100 µl) . Pour cela, ils remplacent l'air par de l'oxygène . Ils parviennent ainsi en quadruplant la sensibilité, à détecter des quantités de barbituriques inférieures au microgramme .

SUNSHINE et FINKLE (54) dans une communication au 16e "National Meeting of American Association of Clinical Chemists" relatent leurs résultats chromatographiques concernant la mise en évidence de barbituriques et d'autres substances dépressives du système nerveux central dans le sang et l'urine en utilisant une colonne de SE 30 .

BROCHMANN -HANSSEN (15-16) dans l'ouvrage "Biomedical Applications of Gaschromatography " , consacrent un chapitre à la séparation et à l'identification des barbituriques . On y trouvera, avec un résumé des travaux antérieurs et des publications précédentes de ces auteurs , une importante bibliographie .

- En 1965 :

GUDZINOWICZ et CLARK (25) partant de quantités très faibles de barbiturique, inférieures à 1 µg, montrent que le temps de rétention varie inversement avec la taille de l'échantillon . De plus, en comparant la sensibilité du détecteur à ionisation de flamme à celle du détecteur à capture d'électrons, ils concluent que ce dernier présente une plus grande sensibilité vis-à-vis de certains barbituriques, méphobarbital, hexobarbital, amobarbital en particulier .

BRADDOCK et MAREC (12) s'attachent surtout à la détection et au dosage de très faibles quantités de barbituriques . Comme les auteurs précédents, ils constatent que, dans ces conditions, les temps de rétention varient en fonction inverse du volume de l'échantillon . Ils estiment que le minimum détectable est de l'ordre de 2 à 5 nanogrammes/ µl selon la nature du barbiturique étudié .

REITH, VAN DER HEIDE et ZWALL (46) ne parvenant pas à séparer sur colonnes d'Apiezon L certains couples de barbituriques (butalbital-butobarbital, thiobarbital-méphobarbital, phénobarbital-cyclobarbital) proposent l'action de l'eau de brome qui, par bromuration, permet l'identification des deux premiers et par oxydation, transforme le thiopental en pentobarbital . L'oxydation permanganique altère le cyclobarbital, tandis qu'elle laisse intact le phénobarbital .

LODI et MAROZZI (34) à partir de solutions pures et de quelques extraits biologiques (utilisant dans ce dernier cas la méthode d'extraction classique de STASS-OTTO) étudient un grand nombre de substances médicamenteuses, parmi lesquelles figurent trois barbituriques . Les temps de rétention sur colonne de SE 30 sont déterminés à différentes températures . Les résultats sont comparés à ceux qu'on obtient par les méthodes de chromatographie en couche mince et de spectrophotométrie .

NIYOGI, CORDOVA et RIEDERS (40), à propos d'un cas d'intoxication massive mortelle par le sécobarbital, sont amenés à doser le barbiturique et ses métabolites dans différents viscères en utilisant une colonne de D. C. 200 Silicone . Ils envisagent également la séparation de quelques barbituriques et d'autres substances médicamenteuses telles que méprobamate, doridène, noludar.

- En 1966 :

MARTIN et DRISCOLL (37) désirant améliorer la qualité des pics et augmenter la sensibilité, préconisent une méthylation du noyau de la malonylurée . Ils s'adressent à la méthode de STUCKEY, (53) , qui consiste à utiliser le sulfate diméthylique comme agent de méthylation . Les résultats sont excellents . Cependant, ils constatent que, sur colonne de SE 30 et dans les conditions de température où ils se placent, amobarbital et pentobarbital se séparent mal . De plus, le méphobarbital est, dans ces conditions, transformé en phénobarbital .

MAC MARTIN et STREET (38-39) orientent principalement leurs recherches sur les applications biologiques. Ils décrivent en détail les méthodes de défécation, d'extraction et de purification utilisées pour les échantillons de sang et de tissu hépatique . Les barbituriques ne subissent pas de transformation chimique de leur molécule . Les auteurs utilisent une colonne de SE 30 - tristéarine et une colonne QF 1 . Contrairement à d'autres chercheurs, ils constatent que même pour des concentrations très faibles (de l'ordre du sub-microgramme) dans leurs conditions de travail, les temps de rétention ne sont pas influencés par les quantités injectées . Enfin, ils envisagent les possibilités d'interférence avec d'autres substances médicamenteuses susceptibles d'être extraites des liquides biologiques en même temps que les barbituriques : aspirine, acide salicylique, doridène, mégimide, caféine . Parmi ces dérivés , certains interfèrent avec les barbituriques. C'est le cas du doridène qui sur colonne de SE 30- tristéarine est

élué avec l'hexobarbital . Mais il suffit d'utiliser une colonne polaire pour obtenir une séparation ou bien d'exploiter la propriété d'instabilité du doridène en solution alcaline diluée . Les auteurs constatent que la caféine a le même temps de rétention que le sécobarbital sur colonne de SE 30, mais que la résolution est possible sur colonne QF 1 .

ANDERS (2) étudie particulièrement les taux de récupération de différents barbituriques qu'il s'efforce d'améliorer afin de pouvoir utiliser des volumes réduits de sang capillaire prélevé au lobule de l'oreille ou au doigt. Pour ce faire, il pratique une double extraction, avec ou sans acidification préalable, de 100 µl de sang, par une quantité de chloroforme équivalente . Selon la nature du barbiturique et son degré d'ionisation, la quantité optimale extraite se trouvera dans l'une ou l'autre des phases organiques . Enfin, l'auteur préconise la saturation préalable de la colonne pour obtenir des résultats quantitatifs meilleurs .

STEVENSON (48) reprend la méthylation du noyau barbiturique afin d'en diminuer la polarité et d'améliorer ainsi les pics chromatographiques et s'adresse à un dérivé d'ammonium quaternaire : l'hydroxyde de tétraméthylammonium . La technique de méthylation est simple . Elle se borne à injecter simultanément le ou les barbituriques et le réactif . La méthylation s'opère au sein même de l'injecteur . L'auteur , qui n'a travaillé que sur des solutions pures, envisage ultérieurement des applications biologiques .

KAMM et VAN LOON (31) soumettent des extraits urinaires de sujets ayant reçu différentes doses d'amobarbital à une silylation , puis à une chromatographie sur colonne SE 30 . Ils mettent ainsi en évidence un dérivé hydroxylé du barbiturique et en étudient les taux d'élimination en fonction du temps et des doses ingérées .

- En 1967 :

ANDERS et MANNERING (3) dans une revue générale très documentée sur les applications à la toxicologie de la chromatographie en phase gazeuse, consacrent un chapitre à l'exposé des principales modalités de cette technique utilisée jusqu'alors pour la recherche et le dosage des barbituriques .

JAIN et KIRK (28-29) décrivent un procédé d'extraction rapide sans ajustement de pH et en partant de faibles quantités de sang (400 µl) . Le solvant d'extraction est un mélange à parties égales d'acétone et d'éther . Ils utilisent une colonne dont la phase stationnaire est constituée par du succinate de cyclohexane dimethanol . La résolution de 23 barbituriques est ainsi obtenue . Les auteurs appliquent leur méthode à l'étude des concentrations sanguines de quelques barbituriques après administration orale de quantités connues de médicaments .

PARKER, WRIGHT, HALPERN et HINE (44) , tout comme STEVENSON , procèdent à une méthylation des barbituriques extraits du sang ou de l'urine, par l'hydroxyde de tétraméthylammonium, pour confirmer l'identification réalisée sur les barbituriques non modifiés . De plus, ils montrent que l'addition de pepsine au sang entraîne une augmentation du taux de récupération . Les phases stationnaires utilisées sont QF 1, SE 30 ou mélange de QF 1 et SE 30 . Les colonnes de verre borosilicaté sont traitées préalablement par le BSA .

GUDZINOWICZ (26) consacre un très important chapitre aux barbituriques dans l'ouvrage intitulé " Gaz Chromatographic Analysis of Drugs and Pesticids " . Ses travaux antérieurs, ainsi que ceux de nombreux auteurs , y sont très largement exposés et analysés .

- En 1968 :

BLACKMORE et JENKINS (7) silanisent les colonnes (Apiezon L, SE 30, SE 52, NGS) par introduction directe dans le chromatographe d'une solution de diméthyldichlorosilane dans l'alcool . D'autre part, ils évitent l'extraction des barbituriques et injectent directement l'urine non traitée . Les résultats sont, de ce fait, obtenus dans un temps minimum .

LEACH et TOSELAND (33) retiennent Apiezon L, XE 60 et Carbowax comme phases stationnaires . Ils pratiquent des injections liquides ou solides et comparent les résultats des dosages obtenus en chromatographie en phase gazeuse et en spectrophotométrie .

SUNSHINE , MAES et FINKLE (55) après une revue générale des différentes méthodes de détection et d'identification des barbituriques dans les liquides biologiques, étudient comparativement les résultats qu'ils obtiennent, avec les méthodes de chromatographie en phase gazeuse, chromatographie en couche mince et spectrophotométrie ultraviolette . Ils estiment que la durée d'analyse est à peu près identique dans tous les cas . Ils reconnaissent que le dosage du phénobarbital est impossible en chromatographie en phase gazeuse du fait de l'obtention d'un pic traînant .

THOMPSON et DECKER (57) s'attachent à l'identification sur une même colonne (SE 30) et à deux températures différentes, de 5 barbituriques et 25 autres composés extraits d'échantillons sanguins . Ils estiment que l'identification et le dosage peuvent être réalisés en un temps ne dépassant pas 30 minutes et que, de ce fait, la technique est applicable en toxicologie clinique .

MACHATA et BATTISTA (35) établissent les indices de rétention relatifs de 20 barbituriques, 3 hydantoïnes

et 7 autres drogues en utilisant différentes phases stationnaires, notamment Carbowax 20 M, Apiezon M, SE 30, SE 52 . Une séparation complète du phénobarbital et du cyclobarbital est obtenue .

BOGAN et SMITH (9) étudiant la transformation dans l'organisme de la primidone en phénobarbital, dosent ces deux substances dans le sang et l'urine par chromatographie en phase gazeuse . Dans ce but, ils utilisent une colonne dont la phase stationnaire est constituée de SE 30 . Les deux dérivés sont bien séparés .

- En 1969 :

BALASUBRAMANIAM , MAWER et RODGERS (6) associent la chromatographie en phase gazeuse avec la chromatographie en couche mince . Les spots obtenus avec cette dernière méthode sont en effet repris par un solvant et la solution obtenue injectée dans la colonne dont la phase stationnaire est NPGA .

DOUGLAS, SMITH et STOCKAGE (22), étudient les possibilités d'identification et de dosage des carbamates dans les liquides biologiques et se préoccupent des interférences possibles avec les barbituriques et autres drogues telles que la caféine . En utilisant SE 30 et QF 1 comme phases stationnaires, ils constatent que le sécobarbital, la caféine et le méprobamate ont des indices de rétention voisins sur SE 30 mais sont séparés sur QF 1 .

STREET (50-51-52) a recours à la silylation des barbituriques pour en diminuer la polarité . Il utilise à cet effet comme réactif de silylation le BSA ajouté à la solution de barbituriques dans la seringue même qui servira à l'injection . Cette technique conduit à de très bons résultats en raison d'une sensibilité accrue et de l'obtention de pics très symétriques . L'hexobarbital fait exception à la règle générale du fait de l'existence d'un groupement méthyle qui s'oppose à une silylation complète de l'azote demeuré libre .

BROCHMANN-HANSSEN, OLAWUYI OKE (17) reprennent la technique de méthylation des barbituriques à l'aide des hydroxydes d'ammonium quaternaire . Ils s'adressent alors à l'hydroxyde de triméthylanilinium. La réaction s'effectue au sein de la colonne et les auteurs obtiennent, avec cette méthode extrêmement rapide, des résultats très satisfaisants .

- En 1970 :

BLOOMER, MADDOK, SHEEHE et ADAMS (8) appliquent la méthode chromatographique à l'analyse d'échantillons de sang provenant de 41 cas de comas d'origine toxique . Dans 37 cas, ils mettent en évidence des barbituriques, du méprobamate, de la glutéthimide à des doses justifiant l'existence d'un coma . Ces auteurs mettent l'accent sur les possibilités qu'offre la chromatographie en phase gazeuse en toxicologie clinique courante .

GROVE et TOSELAND (24) étudient particulièrement l'élimination urinaire d'un métabolite de l'amobarbital , l'hydroxyamobarbital tout en dosant également le barbiturique non modifié . Ils utilisent comme phase stationnaire FFAP et Apiezon L . Afin d'éliminer des pics parasites, ils préconisent une purification préalable de l'urine par passage sur florisil .

WELTON (61) , afin d'éviter les phénomènes d'adsorption qui rendent difficile la détection des substances à l'état de traces, conseille d'ajouter au gaz vecteur de l'acide formique selon la technique décrite par ACKMAN et BURGHER (1) .

VAN METER, BUCKMASTER et SHELLEY (60) dosent le phénobarbital et la diphénylhydantoïne dans des

échantillons sanguins provenant de malades recevant des doses thérapeutiques de ces drogues . Ils procèdent à des injections solides et introduisent la primidone comme étalon interne . La phase stationnaire est constituée par OV 1 .

Enfin, la Société SUPELCO (4) préconise l'utilisation de phases stationnaires dénommées PPE 20 et SP 1000 qui permettraient la séparation de 7 barbituriques (dont le phénobarbital qui présente un des temps de rétention les plus longs) respectivement en 3 et 8 minutes .

L'ensemble de ce chapitre est résumé dans les tableaux synoptiques III et IV .

OBTENTION DE L'ECHANTILLON A CHROMATOGRAPHIER

* - SP : solutions pures
** - B : barbituriques
*** - HO^- : purification par passage en solution alcaline suivie d'une acidification et d'une seconde extraction.
**** - W : défécation sulfotungstique

Date	AUTEURS	Substances étudiées	Nature de l'échantillon	Extraction				Modification de la molécule	Dosage	Etalon interne
				Acidification	Défécation	Solvants	Purification			
1960	JANAK (30)	14 B**	SP*					Pyrolyse		
1961	BROCHMANN HANSSEN (13)	12 B + Glutéthimide Sédormid	SP							
	PARKER (41)	23 B	Sang post-mortem			$CHCl_3$	HO^-***		+	
	COOK (21)	11 B	SP			Ether	Lavage bicarbonaté	Méthylation Diazométhane		
1962	BROCHMANN HANSSEN (14)	21 B Glutéthimide Sédormid	SP							
	SVENDSEN (56)	5 B + Métabolites	Urines	HCl		Ether	HO^-			
	VANDEN-HEUVEL (59)	6	SP							

Date	AUTEURS	Substances étudiées	Nature de l'échantillon	Extraction				Modification de la molécule	Dosage	Etalon interne
				Acidification	Défécation	Solvants	Purification			
1963	CIEPLINSKI (19)	6	SP						+	
	KAZYAK (32)	5 B + 59 autres drogues	Urines	3 extractions à différents pH		$CHCl_3$				
	FURANO (23)	Pentothal Pentobarbital	Sang	pH 1 HCl		$CHCl_3$	HO^-			
	PARKER (41-42-43)	28	SP							
1964	JAIN (27)	6 B	Sang	pas d'acidification		Ether } Acétone } = aa			+	
	SUNSHINE (54)	B+ - Gluthéthimide. Méprobamate	Sang Urines							
1965	GUDZINOWICZ (25)	5 B	SP							
	BRADDOCK (12)		≠ liquides et tissus biologiques						+	Barbital
	REITH (46)	16 B	Sang	HCl NaCl		$CHCl_3$			+	

Date	AUTEURS	Substances étudiées	Nature de l'échantillon	Extraction				Modification de la molécule	Dosage	Etalon interne
				Acidification	Défécation	Solvants	Purification			
1965	LODI (34)	3 B + autres drogues	SP Urines Viscères	Stass Otto		Ether				
	NIYOGI (40)	Sécobarbital + Métabolites + autres drogues	Liquides biologiques Viscères	HCl		$CHCl_3$	HO^-			
1966	MARTIN (37)	5 B	Sang	NaH_2PO_4		Ether		Méthylation $(CH_3)_2SO_4$		
	Mac MARTIN (38-39)	11 B + autres drogues	SP Sang, Foie		W ****	Ether	HO^-			
	ANDERS (2)	5 B	Sang	1° méthode pas d'acidification 2° méthode pH : 5-7 NaH_2PO_4		$CHCl_3$				
	STEVENSON (48)	13	SP					Méthylation Hydroxyde de tétraméthyl ammonium		
	KAMM (31)	Métabolite Amobarbital	Urines	pH 6		Ether		Silylation HMDS + CTS		

Date	AUTEURS	Substances étudiées	Nature de l'échantillon	Extraction				Modification de la molécule	Dosage	Etalon interne
				Acidification	Défécation	Solvants	Purification			
1967	JAIN (28-29)	23 B	SP Sang Viscères	Pas d'acidification		Acétone) Ether) = aā				
	PARKER (44)	6 B + Métabolites + autres drogues	Sang Urines	pH 5,5 NaH_2PO_4		$CHCl_3$ ou Dichloro éthylène		Méthylation Hydroxyde de tétraméthyl ammonium		Phtalate dibutyle Tétraphényl éthylène
1968	LEACH (33)	14 B + Métabolites + autres drogues	Sang	pH 6,5 et pH 7,4 NaH_2PO_4		$CHCl_3$	HO^-		+	Pentobarbital Amobarbital Cyclobarbital
	SUNSHINE (55)	7 B	Sang ≠ Liquides biologiques Tissus			$CHCl_3$	HO^-		+	Aminopyrine
	THOMPSON (57)	5 B + 25 autres drogues	Sang	pH 6,5		$CHCl_3$				
	MACHATA (35)	20 B	Viscères	Stass		Acétone Ether				
	BOGAN (9)	Phénobarbital Primidone	Sang Urines	pH 3		$CHCl_3$	HO^-			

Date	AUTEURS	Substances étudiées	Nature de l'échantillon	Extraction				Modification de la molécule	Dosage	Etalon interne
				Acidification	Défécation	Solvants	Purification			
1968	BLACKMORE (7)	7 B	Urines	Pas d'extraction Urine injectée en nature						
1969	BALASUBRAMANIAN (6)	2 B + Métabolites	Sang	Acidification + Am_2SO_4		Ether	Chromatographie s/ plaque			Quinalbitone Cyclobarbitone
	DOUGLAS (22)	6 B + autres drogues	Liquides biologiques non précisés.			$CHCl_3$				Phtalate dibutyle
	STREET (50-51-52)	9 B + autres drogues	Urines Sang Foie	pH 7,3 NaH_2PO_4	W	Ether	HO^-	Silylation BSA		
	BROCHMANN-HANSSEN (17)	12 B + autres drogues	SP					Méthylation Hydroxyde de triméthyl anilinium		
1970	BLOOMER (8)	5 B + Méprobamate glutéthimide	Sang	pH 4,5		$CHCl_3$	HO^-			

Date	AUTEURS	Substances étudiées	Nature de l'échantillon	Extraction				Modification de la molécule	Dosage	Etalon interne
				Acidification	Défécation	Solvants	Purification			
1970	GROVE (24)	7 B + Métabolite	Sang Urines		W (Sang) Florisil (Urines)				+	Triphénylène
	WELTON (61)	6 B	SP							
	VAN METER (60)	Phénobarbital Diphénylhydantoïne	Sang	pH 6,8		$CHCl_3$	HO^-		+	Primidone
	Anonyme (4)	13 B + Meprobamate Glutéthimide	SP							Phtalate dioctyle

CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

Date	AUTEURS	Appareillage	Colonne	Support	Phase stationnaire	Température de la colonne	Détecteur
1960	JANAK (30)	Laboratory instrument (Prague)		Célite 545	Squalane 30 %		IF
1961	BROCHMANN - HANSSEN (13)			Chrom. W	Apiezon L 1 ou 2 %	150° C	Ionisation Argon
	PARKER (41)	PYE	verre 4' 5mm	Firebrick	SE_{30} 5 %	180° C	Ionisation ^{90}Sr Ar
	COOK (21)		130 cm 4 mm	Célite 545	Apiezon L 15 % Polyéthylène glycol adipate 10 %	197° C 180° C	Ionisation ^{90}Sr Ar
1962	BROCHMANN-HANSSEN (14)	Barber Colman	verre 6' 3mm	Chrom. W HMDS	Apiezon L SE_{30} 1 % SE_{52} NGSE PEG 4000 QF_1 0,065	150° C 137° C 144° C 200° C 170° C 165° C	Ionisation Ar
	SVENDSEN (56)			Chrom. W	Apiezon L 1,4 % NGSE 1,7 %		Ionisation Ar
	VANDENHEUVEL (59		verre 6' 4mm	Gas Chrom.P	SE_{30} QF_1 NGS	186° C 210° C 209°	Ionisation Ar

Date	AUTEURS	Appareillage	Colonne	Support	Phase stationnaire	Température de la colonne	Détecteur
1963	CIEPLINSKI (19)	Perkin Elmer 800	6' 1/8"	Chrom W HMDS + acide C_{36} + acide C_{54}	SE_{30} 1,5 % Néopentylglycol adipate 3 %		IF
	KAZYAK (32)	Barber Colman	verre 6' 4mm	Anakrom ABS	SE_{30} 1 % SE_{30} 5 % QF_1 3 %	185-130-225°C 195° C 200-240° C	Ionisation ^{90}Sr Ar
	FURANO (23)	Barber Colman	4'		N A T 3 %	200° C	IF
	PARKER (41-42-43)	HY-FI	inox 2,5' 1/8" 5'	FirebrickHMDS Chrom W	SE_{30} 1,5 % Carb 20M 2 % NGS 3 %	210° C 230° C	IF
1964	JAIN (27)	HY-FI	inox 2,5' 1/8"	Firebrick	SE_{30} 1,5 % Carb 20M 2 %		IF-O_2 à la place de l'air
	SUNSHINE (54)			Gas Chrom S	SE_{30} 5 %		IF
1965	BRADDOCK (12)	F et M 400	verre 4' 3mm	Chrom W	SE_{30} 3,8 %	155° C 175° C	IF
	GUDZINOWICZ (25)	JARREL-ASH 28-710	verre 4' 3/16"	Anachrom AS	SE_{30} 3 %	190° C	IF CE
	REITH (46)	Becker	aluminium 120cm 4mm	Célite 545 silanisée	Apiezon L 10 %	190° C	IF
	LODI (34)	Carlo-Erba Fracto-Vap	verre 2 m	Gas Chrom P silanisé	SE_{30} 1 %	152° C 210° C 225° C	IF

Date	AUTEURS	Appareillage	Colonne	Support	Phase stationnaire	Température de la colonne	Détecteur
1965	NIYOGI (40)	Research Specialities Richmond 60-10	inox 6' 1/8"	Chrom W	DC 200 5 %	165° C	IF
1966	MARTIN (37)	Jarrel ASH 28-700	Cuivre 4' 1/8"	Anakrom ABS	SE_{30} 5 %	170° C 175° C 180° C	IF
	Mac MARTIN (38-39)	Perkin-Elmer 800	inox 6' 1/8"	Chrom W	.SE_{30} 2 % + Tristéarine 0,1% .QF_1	160° C 155° ↗	IF
	ANDERS (2)	Barber Colman 5000	verre 5' 3,5mm	Gas Chrom Q	DC 200 3,4 %	153° C à 179° C	IF
	STEVENSON (48)	HI-FY 600 D	inox 5' 1/8"	Gas Chrom W	SE_{30} 5 %	130° C	IF
	KAMM (31)	F et M 400	inox 18'	Diatoport S	SE_{30} 3,8 %	160° C	IF
1967	JAIN (28-29)	HI-FY 600	verre 3' 1/8"	Gas Chrom Q	Hi-Eff 813	195°C 220° C	IF
	PARKER (44)	Varian Aerograph 600 C Varian Aerograph 600 D	inox 5'et 6' 1/8" Silanisée BSA	Chrom W HP	SE_{30} 3 % QF_1 6 % SE_{30} 3 % QF_1 6 %	200° C 205° C 220° C	IF

Date	AUTEURS	Appareillage	Colonne	Support	Phase stationnaire	Température de la colonne	Détecteur
1968	LEACH (33)	PYE	verre 1,2m 6mm	Chrom W DMCS	Apiezon L 10 %	200 à 225° C	IF Ionisation ^{90}Sr Ar
		PYE Panchromatograph	verre 1,5m 6mm				
	SUNSHINE (55)	F et M 810 ou 402	verre 6'	Diatoport S	SE_{30} 3,8 %	175° C	IF
	THOMPSON (57)	Barber Colman	verre 6'	Chrom W AW	SE_{30} 5 %	190° C 240° C	Ionisation ^{90}Sr Ar
	MACHATA (35)	Perkin-Elmer	verre 2m 2,7mm	Chrom G (Sil)	Apiezon M 4 % SE_{30} 1 % SE_{52} 2,5 % Carb 20M 0,5 %	215° C 165° C 200° C 215° C	IF
	BOGAN (9)	?	inox 6' 1/8"	Aeropak 30	SE_{30} 5 %	180° C	IF
	BLACKMORE (7)	Perkin-Elmer F 11 PYE 104	verre 6' 5'	Chrom W silanisé	NPGA 3 % Ac.trimère 0,75%	220° C	IF
1969	BALASUBRAMANIAM (6)	PYE 104		Chrom W AW, DCMS	NPGA 3 % Ac.trimère 0,75%	180° C	IF
	DOUGLAS (22)	F et M 402	verre 4'	Diatoport S	UCW 98 3,8 % QF_1 3 %	180° C 180° C	IF

Date	AUTEURS	Appareillage	Colonne	Support	Phase stationnaire	Température de la colonne	Détecteur
1969	STREET (50-51-52)	F et M 810	inox 6' 1/8"	Chrom W Chrom G	SE_{30} SE_{52}		IF
	BROCHMANN-HANSSEN (17)	HY-FI 600 B	inox 5' 1/8"	Gaz Chrom Q	SE_{30} 3 %	130°	IF
1970	BLOOMER (8)	Chromolab 310	verre 6' 4mm	Chrom W	SE_{30} 3 %	160 à 180° C	Ionisation Ra
	GROVE (24)	PYE 104	verre silanisé 5'	Aeropak 30	F F A P 2 %	225° C	IF
	WELTON (61)	Perkin-Elmer	verre 6' 1/4"	Chrom W AW DMCS	Apiezon L 4 % Gaz porteur additionné HCOOH	185° C	IF
	VAN METER (60)	Barber Colman	verre 1,8m 4mm	Supelcoport	OV_1 3 %	220° C	IF
	Anonyme (4)	Packard	verre 3' 2mm	Supelcoport	PPE_{20} 3 % SP 1000 1 %	250° C	

Il ressort de cette longue énumération bibliographique que la majorité des auteurs utilise au moins deux colonnes (l'une de phase stationnaire polaire, l'autre de phase stationnaire apolaire) pour obtenir une séparation correcte des principaux barbituriques . De plus , certains insistent sur la nécessité d'une diminution de la polarité de la molécule barbiturique . Enfin, quelques chercheurs entrevoient les possibilités d'adaptation de la méthode de chromatographie en phase gazeuse à l'analyse toxicologique clinique .

CHAPITRE III

LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE PRINCIPE - GENERALITES

Nous ferons un rappel extrêmement bref de quelques notions générales relatives à la chromatographie en phase gazeuse , technique analytique relativement jeune, mais qui a subi un essor extrêmement rapide et dont le champ d'application est considérable .

Depuis quelques années, elle est devenue un outil précieux en recherche biologique . Il lui reste peut-être encore à conquérir, tout au moins en France, le domaine de la biologie clinique .

Les notions générales qui vont être exposées sont empruntées au "Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse" de TRANCHANT (58), ouvrage indispensable à tout biologiste désireux de se familiariser avec cette technique qui demande un certain apprentissage avant d'être utilisée avec profit .

I - PRINCIPE .

Emis en 1941 par MARTIN et SYNGE , il est identique à celui de la chromatographie sur papier et de la chromatographie liquide-liquide, la phase mobile inerte étant un gaz

vecteur et la phase fixe ou stationnaire soit un solide adsorbant (chromatographie gaz-solide) soit un liquide réparti à la surface d'un support inerte (chromatographie gaz-liquide) .

La phase stationnaire est introduite dans un tube qui constitue ainsi une colonne .

Si on introduit en tête de colonne un corps en phase vapeur, il est poussé par le gaz vecteur et il s'établit en chaque point un équilibre entre la fraction du composé retenue par la phase fixe et celle qui demeure dans la phase mobile .

On appelle coefficient de partage K le rapport :

$$K = \frac{\text{Masse de vapeur par unité de colonne de phase fixe}}{\text{Masse de vapeur par unité de colonne de phase mobile}}.$$

Le composé introduit parcourt toute la longueur de la colonne en un temps qui est lié à son coefficient de partage .

Si dans les mêmes conditions on introduit, simultanément un second composé de coefficient de partage différent, on conçoit qu'il parcourra la colonne en un temps plus ou moins long que l'autre et les deux composés initialement mélangés seront recueillis séparément à l'extrémité terminale de la colonne . Il suffira alors de disposer d'un détecteur convenable couplé à un système d'enregistrement sur lequel se développera le chromatogramme .

II - APPAREILLAGE

Les différents éléments constituant un chromatographe sont les suivants :

- Une source de gaz vecteur sous pression, aussi pur que possible et qui peut être de l'azote, de l'hydrogène, de l'hélium, de l'argon ou du gaz carbonique .
- Une chambre d'injection portée à une température telle que les composés introduits sous forme de solution à l'aide d'une micro-seringue, y sont instantanément volatilisés .
- Une colonne constituée par un tube de matériau inerte (cuivre, acier inoxydable, verre) et qui contient :
  . soit un adsorbant actif (silicagel, aluminium, tamis moléculaire),
  . soit un liquide actif réparti sur un solide poreux inerte chromatographiquement (chromosorb, célite. .).
  La colonne est maintenue dans un four possédant une régulation de température qui doit être aussi précise que possible .
- Un système de détection . On distingue selon leur sensibilité :
  . les détecteurs de sensibilité moyenne :
  .. le catharomètre, le plus courant, basé sur les différences de thermoconductibilité thermique des gaz.
  . les détecteurs très sensibles, utilisant les phénomènes d'ionisation; les plus usuels sont les suivants :
  .. détecteur à ionisation de flamme
  .. détecteur à capture d'électrons
  .. détecteur à ionisation d'argon .
- Un enregistreur qui, après amplification, matérialisera le signal fourni par le détecteur sous forme d'une courbe : le chromatogramme .

III - LE CHROMATOGRAMME - DEFINITION DES GRANDEURS DE RETENTION .

Le chromatogramme d'un composé élué (encore appelé soluté) est schématisé dans la figure suivante (figure n°2) .

Avec les détecteurs couramment utilisés, qui sont du type différentiel et qui répondent donc aux variations de concentration du soluté dans le gaz vecteur, les courbes obtenues sont grossièrement des courbes de Gauss.

Les données déduites d'un certain nombre de mesures effectuées sur le chromatogramme conduisent :

- à une identification (mesure des grandeurs de rétention)
- à une analyse quantitative (mesure de la surface des pics) .

1°- Mesure des grandeurs de rétention.

On définit les grandeurs de rétention suivantes:

- le temps de rétention : t_R , temps nécessaire pour qu'un soluté A parcoure toute la colonne ,

- le volume de rétention : V_R . Pour un débit D_s à la sortie de la colonne, il correspond un volume de rétention : $V_R = D_s \, t_R$

  Si D_s et $\bar{u}_m$ (vitesse linéaire moyenne du gaz porteur) sont constants (chromatographie isotherme et isobare) et si u_ε est la vitesse de déroulement du papier de l'enregistreur, on peut mesurer une distance de rétention d_R .

FIGURE 2

Chromatogramme - type

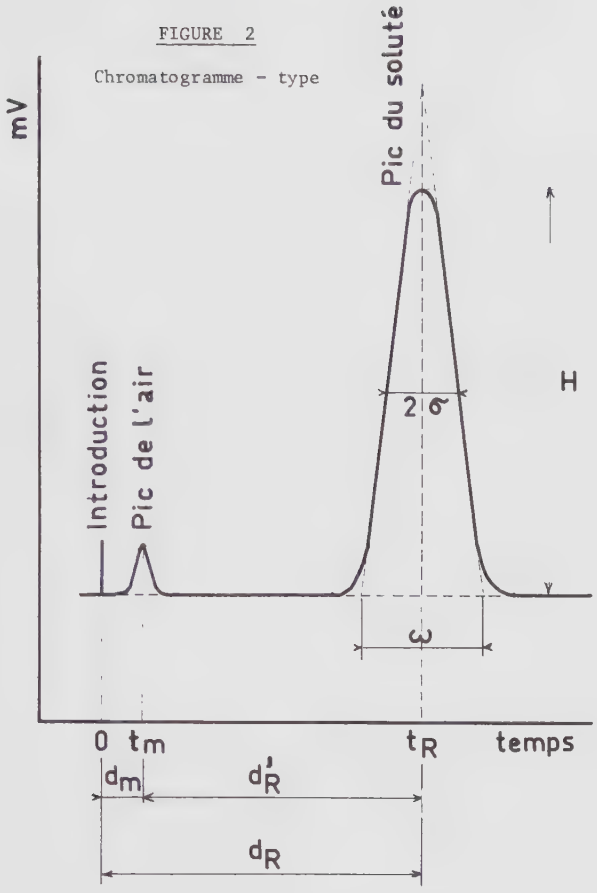
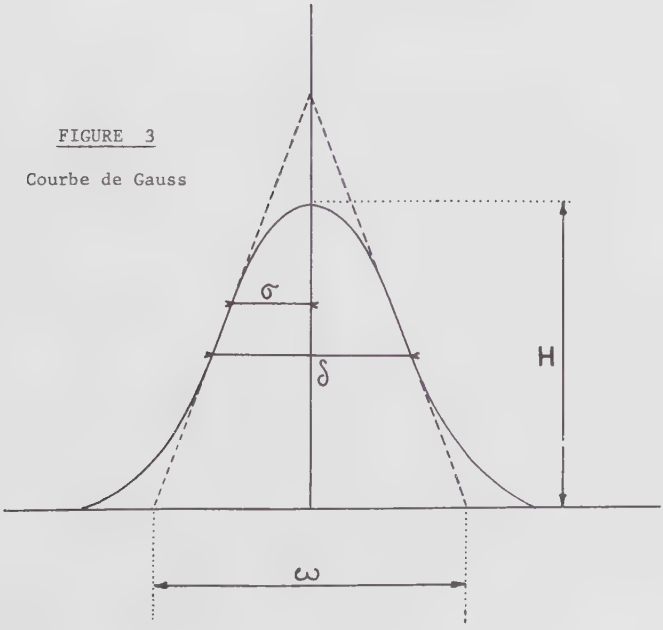


FIGURE 3

Courbe de Gauss



$$d_R = \frac{V_R \, u_\varepsilon}{D_s}$$

Ces grandeurs de rétention ainsi définies ne doivent pas être utilisées directement, les conditions de perfection, d'appareillage qu'elles supposent n'étant jamais remplies . De plus, le temps de parcours de la colonne traduit par la distance d_R est la somme du temps vrai et du temps de parcours des petits volumes morts supplémentaires . On est donc amené à définir des grandeurs de rétention réduites .

- le temps de rétention réduit $t'R$

$$t'_R = t_R - t_m$$

tm = temps de parcours des volumes morts .

- le volume de rétention réduit $V'R$

$$V'_R = D_s \, t'_R = D_s \, (t_R - t_m)$$

$$V'_R = V_R - V_m$$

Il est nécessaire de mesurer le volume mort V_m qu'il est facile de calculer grâce au pic donné par le passage de l'air, dont la rétention par la phase stationnaire est pratiquement nulle .

On définit une distance de rétention réduite, $d'R$:

$$d'_R = d_R - d_m$$

$$V'_R = \frac{D_s \, (d_R - d_m)}{u_\varepsilon}$$

Ces grandeurs réduites supposent une vitesse linéaire du gaz porteur constante tout au long de la colonne ce qui n'est pas réalisé puisqu'il s'établit un gradient de vitesse lié à la perte de charge le long de la colonne . Il convient d'appliquer aux grandeurs de rétention réduites un coefficient de perte de charge j calculé en fonction des pressions d'entrée et de sortie de la colonne. On peut définir ainsi :

- le volume de rétention absolu :

$$V_N = j \frac{Ds \ (d_R - d_m)}{u \ \varepsilon}$$

Enfin, si l'on tient compte de la masse de phase stationnaire dans la colonne m_f et de la température absolue T_c (°K) dont dépendent, pour un même soluté, les valeurs de rétention, on obtient le volume de rétention spécifique V_g :

$$V_g = V_N \frac{273}{mf \ T_c}$$

Le volume de rétention spécifique d'une substance sur une colonne donnée, seule constante de rétention ayant une valeur absolue, est une caractéristique physique de cette substance et sa détermination devrait donc permettre son identification .

2°- Mesure de la surface des pics .

Plusieurs procédés ont été proposés, intégration automatique à l'aide d'intégrateurs électromagnétiques, ou électroniques, intégration mécanique, intégration par pesée, méthodes géométriques . Ce sont ces dernières que nous retiendrons car elles ne nécessitent aucun appareillage et sont donc à la portée de tous les utilisateurs de la chromatographie, et en particulier des plus déshérités , quant à leurs moyens financiers ...

Méthodes géométriques (figure n° 3)

Dans le cas d'un pic symétrique et compte tenu de l'équation de la courbe de Gauss, on démontre que son aire A est liée à sa hauteur H par la relation :

$A = 2,51\ H \times \sigma$, σ étant l'écart-type .

Les tangentes au point d'inflexion délimitent sur la ligne de base une valeur ω égale à 4σ , on peut écrire :

$A = 0,627\ H\ \omega$

La détermination exacte des tangentes à la courbe de Gauss peut être délicate et c'est la raison pour laquelle malgré l'approximation que cela comporte, on préfère utiliser la formule

$A = H\ \delta$, δ étant la largeur du pic mesurée à mi-hauteur .

Cette formule n'est valable que si les pics sont symétriques . Dans le cas contraire (et en dehors de l'utilisation d'un intégrateur ou d'un planimètre), on peut obtenir de bons résultats en découpant le pic en un certain nombre de trapèzes dont on détermine la somme des aires .

IV - IDENTIFICATION PAR LES GRANDEURS CHROMATOGRAPHIQUES .

1°- Identification par les grandeurs de rétention relatives .

Bien que le volume de rétention spécifique soit une valeur de rétention absolue, il n'est pas possible sur cette seule mesure d'identifier une substance du fait que la reproductibilité des volumes chromatographiques est insuffisante .

Par contre, sur des colonnes de même phase stationnaire, les rapports des volumes de rétention des substances soustraction faite des volumes morts, demeurent constants à une même température, quelles que soient les autres conditions opératoires .

Soit :

V_g (A) le volume de rétention spécifique d'un soluté A

V'_R (A) son volume de rétention réduit

d'_R (A) sa distance de rétention réduite

V_g (B) , V'_R (B) , d'_R (B) les mêmes constantes relatives à un soluté B .

On appelle rétention relative le rapport :

$$\alpha_{AB} = \frac{V_g\ (A)}{V_g\ (B)} = \frac{V'_R\ (A)}{V'_R\ (B)} = \frac{d'_R\ (A)}{d'_R\ (B)}$$

Le rapport α_{AB} demeure identique d'une colonne à une autre de même phase stationnaire et il est facile à calculer puisqu'il suffit de mesurer les distances de rétention sur le chromatogramme, à condition d'en soustraire la distance de rétention de l'air.

On conçoit tout l'intérêt de la mesure de ce rapport, si ce dernier est établi à l'aide d'un étalon déterminé.

De nombreux étalons ont été choisis par différents auteurs et des tables ont été publiées dans la littérature. Devant une trop grande diversité des étalons utilisés et afin de normaliser au maximum l'utilisation des données relatives, certains auteurs ont proposé le calcul "d'indices" ou de "facteurs de rétention".

2° - Identification par les indices de rétention Ii (selon KOVATS).

Pour une colonne donnée et une température choisie, le logarithme des volumes de rétention spécifiques est lié linéairement au nombre d'atomes de carbone dans une série homologue (à partir des termes en C_4 ou C_5)

$$\log V_g = a n + b$$

n étant le nombre d'atomes de carbone,
a et b des constantes.

Sur ce principe KOVATS a établi un système très général dans lequel tout corps susceptible d'une analyse chromatographique peut être rapporté à deux paraffines normales.

Par définition KOVATS attribue à ces paraffines des indices égaux à 100 fois leur nombre d'atomes de carbone, soit par exemple 400 pour le butane, 800 pour l'octane.

Le calcul de l'indice de Kovats est basé sur la formule suivante :

$$I_i = 100 \frac{\log V_g(x) - \log V_g(P_z)}{\log V_g(P_{z+1}) - \log V_g(P_z)} + 100\,z$$

dans laquelle $V_g(x)$, $Vg(P_z)$, $Vg(P_{z+1})$ sont les volumes de rétention spécifiques respectivement du composé à identifier, de la paraffine à z atomes de carbone sortant avant le soluté x de la paraffine à z + 1 atomes de carbone, sortant après le soluté x .

Dans la formule ci-dessus on peut remplacer V_g par V_N ou même V'_R ou d'_R .

Pratiquement, le produit à analyser est mélangé aux paraffines choisies pour encadrer le ou les solutés inconnus . A partir du chromatogramme obtenu, on calcule les indices de rétention à l' aide de la mesure des volumes de rétention réduits V'_R ou même plus simplement des distances de rétention réduites .

On trouve, dans la littérature, des tables donnant les indices de Kovats d'un grand nombre de substances pour des colonnes et des températures données .

Les courbes représentatives des équations reliant les indices de rétention des solutés à leurs points d'ébullition pour une même série homologue sont parallèles entre elles quand on les trace pour différentes phases stationnaires .

Une notion intéressante découle de cette influence de la polarité de la phase stationnaire sur les indices de rétention . C'est la notion "d'Incrément d'indice" qui représente l'augmentation d'indice constatée quand on chromatographie un soluté donné successivement sur une phase apolaire puis sur une phase polaire .

$$\Delta I_i = I_p - I_a$$

I_p = indice de rétention sur phase polaire

I_a = indice de rétention sur phase apolaire .

Cet incrément d'indice est lié à la nature des groupes fonctionnels que possède le corps ; on conçoit donc l'intérêt d'une telle indication pour l'identification d'un soluté .

V - ANALYSE QUANTITATIVE .

La quantité de substance éluée est liée à l'aire délimitée par la courbe de Gauss .

Soient :

m_i = masse de substance i ayant traversé le détecteur

A_i = aire du pic lui correspondant

K_i = facteur de proportionnalité

$$m_i = K_i \; A_i$$

1°- Mesure de l'aire du pic .

Une des méthodes parmi les plus courantes a été exposée page 46.

2°- Mesure du coefficient de proportionnalité .

Le coefficient de proportionnalité dépend d'un grand nombre de facteurs .

Du fait de la difficulté d'introduire des masses exactement connues d'un échantillon, la mesure absolue des coefficients de proportionnalité est très difficile à obtenir . Il est plus sûr d'utiliser une méthode relative, soit la normalisation interne, soit l'étalonnage interne .

- Normalisation interne :

Soit un mélange de trois constituants donnant trois pics nettement séparés d'aires respectives A_1 , A_2, A_3. En supposant connus les coefficients de proportionnalité respectifs K_1 , K_2 , K_3 , on peut écrire m_1 étant la masse d'un des trois constituants du mélange ,

$$m_1 \ \% = \frac{K_1 \ A_1}{K_1 A_1 + K_2 A_2 + K_3 A_3} \times 100$$

Il suffit de constituer un mélange étalon avec des pourcentages connus des substances respectives pures pour calculer, pour chacune de ces substances, le coefficient de proportionnalité que l'on reportera ensuite dans la formule précédente .

Cette méthode implique que le chromatogramme obtenu représente bien la totalité des constituants du mélange .

- Etalonnage interne :

Il consiste à introduire en proportion connue dans le mélange à analyser, une substance de référence se séparant bien des autres constituants .

Soient A_1, A_2, A_3, A_E les surfaces des pics des constituants à doser et celle de l'étalon interne ,

m_1, m_2, m_3, m_E les masses correspondantes des constituants à doser et de l'étalon interne (m_E est connue)

K_1, K_2, K_3, K_E les coefficients de proportionnalité :

$$m_1 = m_E \frac{K_1}{K_E} \times \frac{A_1}{A_E}$$

$$m_2 = m_E \frac{K_2}{K_E} \times \frac{A_2}{A_E}$$

$$m_3 = m_E \frac{K_3}{K_E} \times \frac{A_3}{A_E}$$

On constitue un mélange renfermant des doses connues m'_1 , m'_2, m'_3, m_E de ces mêmes constituants .

En appliquant les mêmes formules que précédemment m'_1

$$m'_1 = m_E \frac{K_1}{K_E} \times \frac{A'_1}{A_E}$$

on conçoit que l'on peut en déduire la valeur des différents rapports

$$\frac{K_1}{K_E}, \frac{K_2}{K_E}, \frac{K_3}{K_E}$$

et calculer ainsi m_1, m_2, m_3 .

VI - CARACTERISTIQUES DES COLONNES .

Sur le chromatogramme, la simple mesure de la distance de rétention (d_R) et de ω , égal à 4 fois l'écart type, permet d'évaluer un certain nombre de caractéristiques de la colonne .

1°- Nombre de plateaux théoriques n.

En réalité, il caractérise non seulement l'efficacité de la colonne, mais également celui de l'ensemble de l'appareillage . Il s'obtient à l'aide du calcul suivant :

$$n = \left(\frac{d_R}{\sigma}\right)^2$$

Nous avons déjà dit qu'il était plus commode de mesurer ω (égal à 4 fois σ) d'où :

$$n = 16 \left(\frac{d_R}{\omega}\right)^2$$

Il est plus rigoureux d'effectuer ce calcul à partir de la distance de rétention réduite d'_R, on obtient alors le nombre de plateaux théoriques effectifs n_{eff}

$$n_{eff} = 16 \left(\frac{d'_R}{\omega}\right)^2$$

Le nombre de plateaux théoriques est indépendant de la masse du soluté injecté, mais il dépend de sa nature . En chromatographie gaz-liquide on rapporte assez souvent le nombre de plateaux théoriques au pic du benzène à 80° C .

Le calcul du nombre de plateaux théoriques d'une colonne nouvellement préparée, permet de constater si le remplissage est satisfaisant .

2°- Hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) .

La détermination du nombre de plateaux théoriques permet de calculer la hauteur de chacun de ces plateaux "h" .

$$h = \frac{Lc}{n_{eff}}$$

où Lc est la longueur de la colonne utilisée .

En raison du gradient de vitesse du gaz porteur qui s'établit dans la colonne, la HEPT varie légèrement tout au long de la colonne . Le plus souvent, cependant, on se contente de la hauteur moyenne $\bar{h}$.

Pour une température donnée, la HEPT varie en fonction de la vitesse linéaire du gaz porteur, donc pour une colonne de diamètre donné, de son débit . La courbe représentative des variations de la HEPT en fonction de la vitesse linéaire du gaz porteur se traduit par une hyperbole dont l'équation porte le nom d'équation de Van DEEMTER .

Il existe donc une vitesse linéaire optimale du gaz porteur pour laquelle la HEPT est minimale et qui correspond à l'efficacité maximale de la colonne .

Donc, après avoir constaté, par la mesure du nombre de plateaux théoriques, que le remplissage d'une colonne est convenable, il convient ensuite, avec un soluté donné et à une température choisie, de tracer l'hyperbole ci-dessus et de déterminer ainsi la vitesse optimale du gaz porteur, en pratique son débit à la sortie de la colonne .

Les possibilités offertes par la chromatographie en phase gazeuse en matière d'identification, peuvent être élargies par le couplage de cette technique avec la spectrométrie de masse dont nous allons brièvement rappeler les principes dans le chapitre suivant .

CHAPITRE IV

LA SPECTROMETRIE DE MASSE
PRINCIPES GENERAUX

I - PRINCIPES .

La spectrométrie de masse est basée sur le principe suivant :

- La substance à analyser est ionisée
  soit par bombardement électronique, photoionisation, ou ionisation de champ , s'il s'agit d'un composé organique ,
  soit par ionisation de surface ou création d'étincelles, s'il s'agit d'un composé minéral .

- Les ions ainsi formés sont triés suivant leur rapport m/e (m = masse de l'ion, e = sa charge) et détectés photographiquement ou électriquement .

- Le spectre obtenu permet une détermination précise de la masse de chacun des ions formés et une estimation du nombre des ions de chaque espèce .

II - APPAREILLAGE .

Il comporte quatre parties essentielles :

1°- Système d'introduction :

Il permet de faire pénétrer le produit à analyser dans l'appareil en abaissant sa pression de façon convenable .

2°- Source d'ions :

Les ions peuvent être produits par différents procédés :

- Bombardement de la vapeur d'un composé organique par un faisceau d'électrons d'énergie donnée (source à bombardement électronique)
- Irradiation par des rayons UV de courte longueur d'onde (photo-ionisation) ou par un faisceau laser
- Application d'un champ électrique intense (ionisation de champ)
- Evaporation d'un composé minéral à partir d'une surface métallique chauffée (ionisation de surface)
- Création d'étincelles entre deux électrodes de la substance minérale à analyser .

En chimie organique la source la plus couramment utilisée est du type à bombardement électronique .

Les ions ainsi formés par la collision des molécules avec les électrons sont extraits perpendiculairement au faisceau électronique et accélérés dans un champ électrique intense . A la sortie de la source une fente permet de collimater le faisceau dont une partie est ensuite interceptée par une plaque (" monitor") qui mesure le courant ionique total, avant de pénétrer dans le séparateur .

3°- Analyseur .

La séparation des ions est réalisée par les procédés suivants :

- Déviation dans un champ électrique ,
- Déviation dans un champ électrique puis un champ magnétique ,
- Utilisation des différences de temps de vol dans un champ électrique ,
- Divers moyens utilisant des phénomènes de résonance.

4°- Détecteur :

deux dispositifs sont à retenir :

- Détecteur photographique, surtout utilisé pour les spectographes à étincelles ,
- Détecteur électrique, le plus courant . C'est un collecteur constitué par une électrode sur laquelle viennent se décharger les ions . On peut également utiliser un multiplicateur d'électrons .

III - ASPECT D'UN SPECTRE DE MASSE .

Il se présente sous forme d'une série de pics dont les hauteurs sont proportionnelles au nombre d'ions de chaque espèce . On distingue trois catégories de pics :

1°- Le pic moléculaire ou pic parent ou pic de masse . Il correspond à la masse moléculaire du produit introduit, son intensité est variable et dans certains cas il peut ne pas apparaître .

2°- Les pics de fragmentation sont dûs à la décomposition de l'ion moléculaire en morceaux de masses plus faibles .

3°- Les pics métastables sont les images d'ions dont la décomposition se produit entre la période d'accélération et la séparation . Leur forme est très aplatie (pic diffus) et leur maximum se trouve à une masse m^* telle que si le pic métastable représente l'image d'un ion de masse m_1 se décomposant en un ion de masse m_2 on ait la relation :

$$m^* = \frac{(m_2)^2}{m_1}$$

L'interprétation des spectres est facilitée par l'existence d'atlas où se trouvent répertoriés les spectres d'un grand nombre de composés . Ces spectres sont normalisés c'est-à-dire que les intensités des pics sont données en pourcentage en attribuant la valeur 100 au pic le plus intense (pic de base) .

IV - COUPLAGE SPECTROMETRE DE MASSE - CHROMATOGRAPHE EN PHASE GAZEUSE (fig.n°4)

La chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse sont deux méthodes se complétant pour plusieurs raisons :

- La quantité nécessaire d'échantillon pour l'analyse est du même ordre de grandeur (inférieure à 1 µg) .
- Dans les deux cas, l'analyse se conduit en phase vapeur.
- Les temps demandés par chaque méthode sont compatibles ; un pic de chromatogramme permet d'enregistrer un ou plusieurs spectres de masse .

Mais les deux méthodes diffèrent en ce sens que le chromatographe travaille à la pression atmosphérique avec un gaz vecteur (hélium) ayant un débit compris entre 1 et 60 ml/mn , le spectromètre de masse ne travaille qu'à une pression inférieure à 10^{-4} mmHg . Le problème est résolu de plusieurs façons selon le type de colonne utilisé dans le chromatographe .

- Avec les colonnes capillaires (débit inférieur à 1 ml/mn) le couplage est réalisé directement, la colonne est connectée à la source d'ions sans interface .
- Dans le cas des colonnes garnies, pour lesquelles le débit de gaz vecteur est plus important, un séparateur d'hélium est nécessaire . Trois principaux types de séparateurs sont commercialisés :

  . Type Jet (Becker - Ryhage)
  Dans ce séparateur, les molécules les plus lourdes ne peuvent sortir, tandis que les molécules les plus légères (hélium) circulent préférentiellement dans de petits canaux et sont pompées .

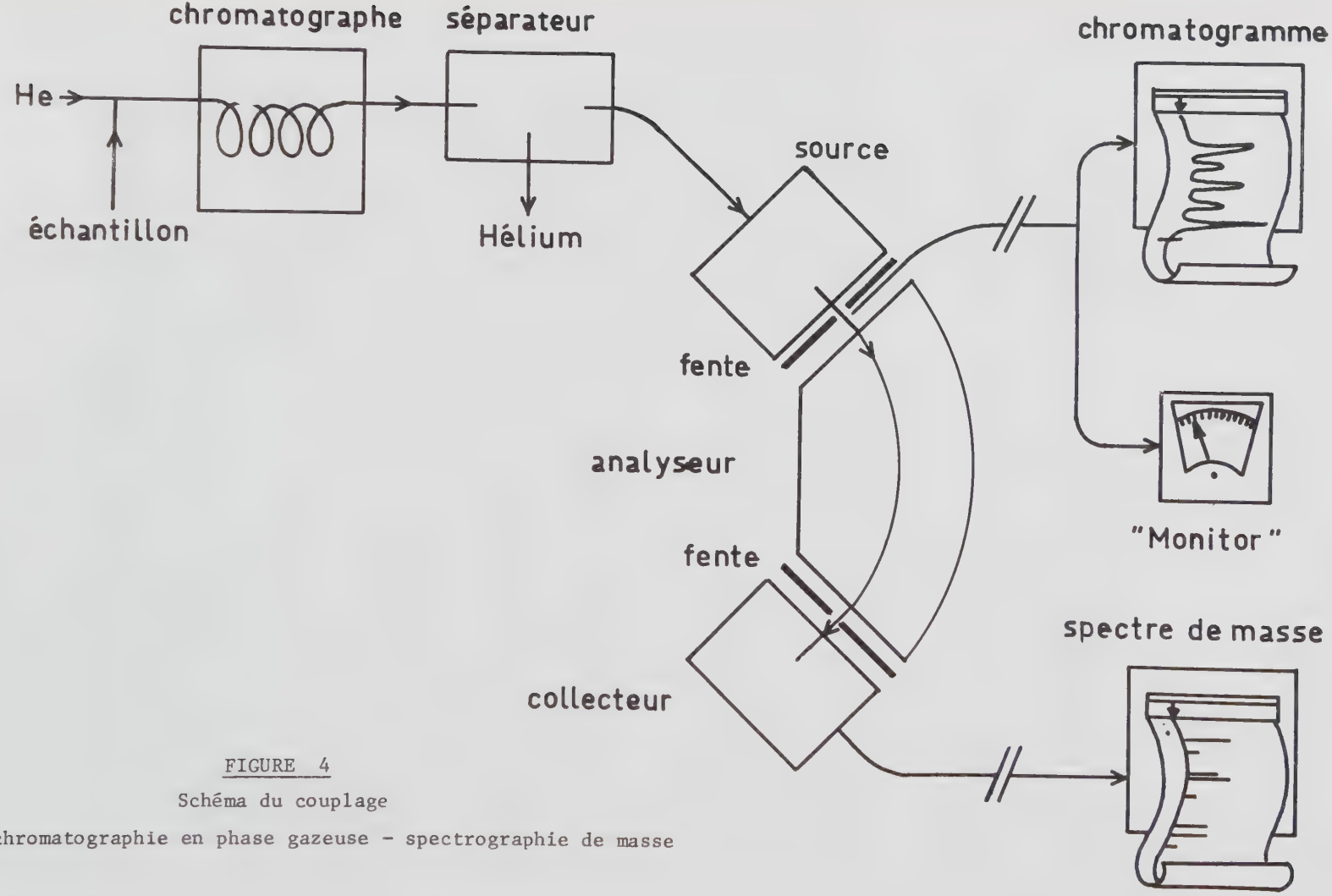


FIGURE 4

Schéma du couplage

chromatographie en phase gazeuse - spectrographie de masse

. Type Biermann - Watson .
Le gaz porteur diffuse à travers un fritté en verre, tandis que le composé est véhiculé vers la source d'ions .

. Type membrane .
Les composés organiques "passent" à travers une membrane en silicone, tandis que les gaz permanents sont arrêtés en majeure partie .

L'intérêt du couplage chromatographe - spectromètre de masse est évident . La spectrométrie de masse, outre sa grande sensibilité se distingue par son pouvoir de détection spécifique pour une quantité très faible de composé . Elle présente certains avantages sur d'autres méthodes analytiques .

- L'infrarouge requiert au moins 20 µg de substance . De plus, les différences entre divers spectres IR sont souvent trop subtiles pour permettre rapidement une interprétation .
- Les spectres UV manquent de spécificité .
- La résonance magnétique nucléaire, qui donne des informations complémentaires de celles données par la spectrométrie de masse nécessite cependant une quantité d'échantillons bien plus importante .

Ainsi se justifie le couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse, dont nous donnerons ultérieurement des exemples d'application .

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I

PREPARATION DE L'ECHANTILLON A CHROMATOGRAPHIER

I - EXTRACTION DU BARBITURIQUE .

Nous avons constaté que si certains auteurs opéraient une défécation préalable à l'extraction, d'autres, par contre n'y avaient pas recours . Nous avons donc essayé les deux techniques et recherché si la défécation qui entraîne une augmentation non négligeable du temps d'analyse est absolument indispensable .

Comme solvant d'extraction, nous avons choisi l'éther, car il a l'avantage, entre autres, d'être volatil à une température relativement basse et d'être dénué de toxicité .

1°- Extraction sans défécation préalable .

- Réactifs :

. Phosphate monosodique en solution aqueuse saturée ,
. Ether Merck .

- Technique :

Elle est décrite dans l'article de BRACHET-LIERMAIN , MICHON, FERRUS (11) .

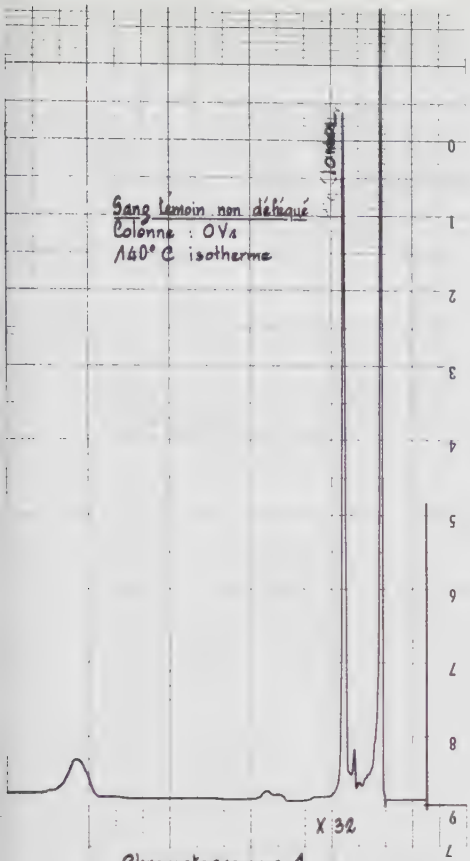
3 ml de sang sont additionnés de 3ml d'une solution saturée de phosphate monosodique . On extrait par 10 ml d'éther que l'on évapore . Le résidu est ensuite soumis à une méthylation , opération rendue nécessaire pour l'obtention de pics chromatographiques corrects . Les détails de cette méthylation seront exposés plus loin. Si l'on soumet une telle préparation à l'analyse chromatographique : l'examen des tracés 1 et 2 obtenus sur OV1 et OV225 montre de nombreux pics dont un pic particulièrement important que nous appellerons pic C . Parce qu'ils se situent dans la zone d'élution des barbituriques, quelques-uns de ces pics sont gênants . Nous avons donc pensé à les éliminer par une défécation du sang préalable à l'extraction .

2°- Extraction après défécation .

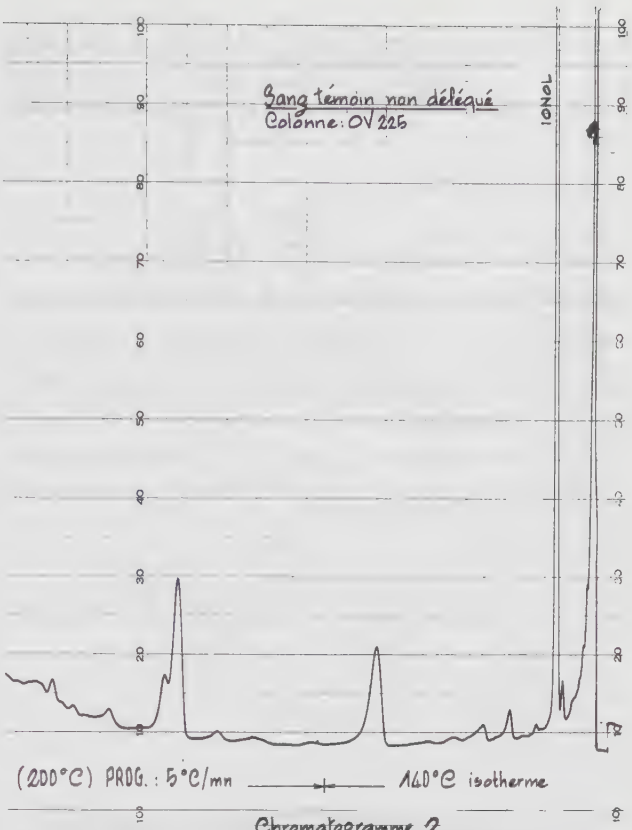
a) Choix d'un réactif de défécation .

- A priori, il serait logique de procéder à une défécation alcaline qui donne un surnageant dans lequel les barbituriques sont sous forme basique, c'est-à-dire soluble . Nous avons essayé une défécation à l'hydroxyde de zinc . Pour cela, nous avons ajouté du sulfate de zinc au sang , puis alcalinisé par de la soude . La défécation est incomplète car le surnageant reste rose et s'émulsionne facilement avec l'éther . Il nous a donc fallu écarter ce mode de défécation .

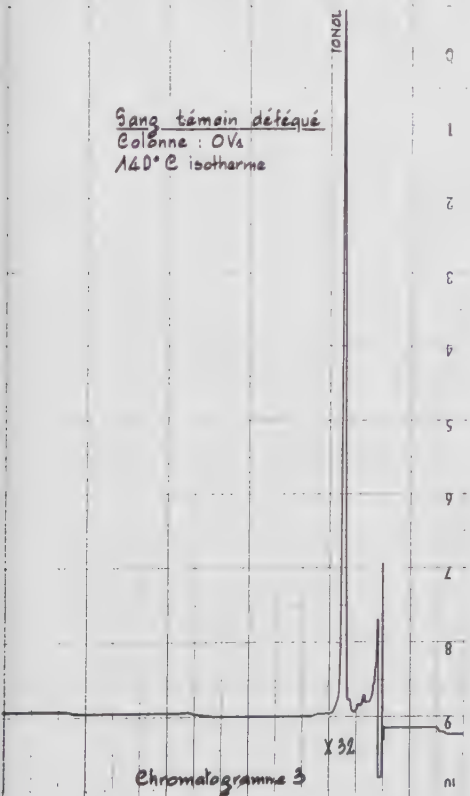
- La défécation acide offre un plus grand choix de réactifs . Cependant les réactifs trop oxydants tels que l'acide métaphosphorique ou l'acide perchlorique sont à



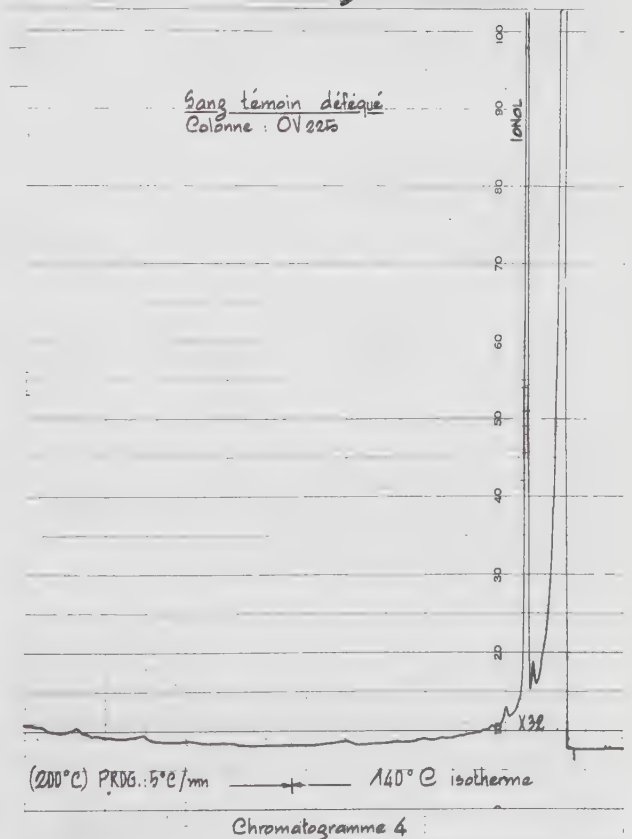
Chromatogramme 1



Chromatogramme 2



Chromatogramme 3



Chromatogramme 4

éliminer car ils sont incompatibles avec une bonne stabilité des barbituriques . Nous avons opté pour la défécation sulfotungstique procédé souvent employé par les auteurs qui ont recours à la méthode de chromatographie en couche mince .

b) Réactifs .

- Solution saturée de phosphate monosodique
- Tungstate de sodium à 20 p. 100
- Acide Sulfurique 2/3 N
- Ether Merck .

c) Technique :

3 ml de sang sont additionnés de 3 ml de solution de tungstate de sodium et 5 ml d'acide sulfurique. Après mélange, on laisse 10 minutes au repos et on centrifuge à 3000 t/mn pendant 5 minutes .

5 ml de surnageant sont additionnés de 3 ml de tampon phosphate et extraits par 10 ml d'éther durant 5 minutes au moyen d'un agitateur mécanique . La phase éthérée est ensuite évaporée et le résidu, comme précédemment, est soumis à la méthylation .

d) Si on compare les chromatogrammes 3 et 4 obtenus sur OV1 et OV225 respectivement aux chromatogrammes 1 et 2, on constate que la défécation ne laisse subsister que le pic C. Nous verrons ultérieurement qu'il se différencie nettement des pics des barbituriques , sa persistance après défécation n'est donc pas gênante .

En définitive, nous avons retenu la défécation sulfotungstique, car cette manipulation supplémentaire présente l'intérêt d'éliminer des composés du sang susceptibles d'interférer avec les barbituriques ainsi que des substances à hauts poids moléculaires qui, par une élution trop tardive, gêneraient des analyses répétées .

II - DIMINUTION DE LA POLARITE DE LA MOLECULE.

Nous avons constaté que la qualité des pics chromatographiques obtenus à partir de solutions de barbituriques purs est variable selon la nature de la molécule . En particulier le phénobarbital , produit très fréquemment rencontré au cours des intoxications, donne un pic présentant une traînée importante . De plus, sa sensibilité vis-à-vis du détecteur à ionisation de flamme s'avère réduite . C'est la raison pour laquelle nous avons étudié les différentes techniques de transformation du noyau barbiturique qui conduisent à une diminution de polarité de la molécule , dans le but d'obtenir des pics plus symétriques se prêtant alors à un essai quantitatif . Cette diminution de polarité de la molécule est obtenue par la substitution des hydrogènes liés à l'azote, en particulier par des groupements triméthylsilyle ou méthyle .

1°- Substitution par des groupements triméthylsilyle .

Parmi les nombreux réactifs et techniques de silylation proposés (45), nous avons choisi la bis N, O , triméthylsilylacétamide ou BSA (*) préconisée par STREET (52) .

a) Préparation du BSA .

Dans un grignard de 4 litres balayé par un courant d'azote desséché sur chlorure de calcium, on introduit 99g d'acétamide et 1 litre de triéthylamine distillée et séchée .

(*) *Qu'il nous soit permis de remercier Monsieur le Professeur CALAS, Professeur de Chimie Organique de la Faculté des Sciences de Bordeaux qui nous a fourni le B.S.A.*

Après dissolution, on verse, tout en agitant, 487 g de chlorure de triméthylsilyle . Le mélange est chauffé à reflux durant 15 h. On laisse reposer et on essore . On lave à plusieurs reprises avec 500 ml au total de triéthylamine . On essore à nouveau . On élimine par distillation la triéthylamine sous pression normale puis, à la trompe à eau . Le produit est ensuite distillé au bain d'huile à 100° -110° sous vide .

Eb_{30} = 71 - 72° C

Eb_{50} = 75 - 77° C .

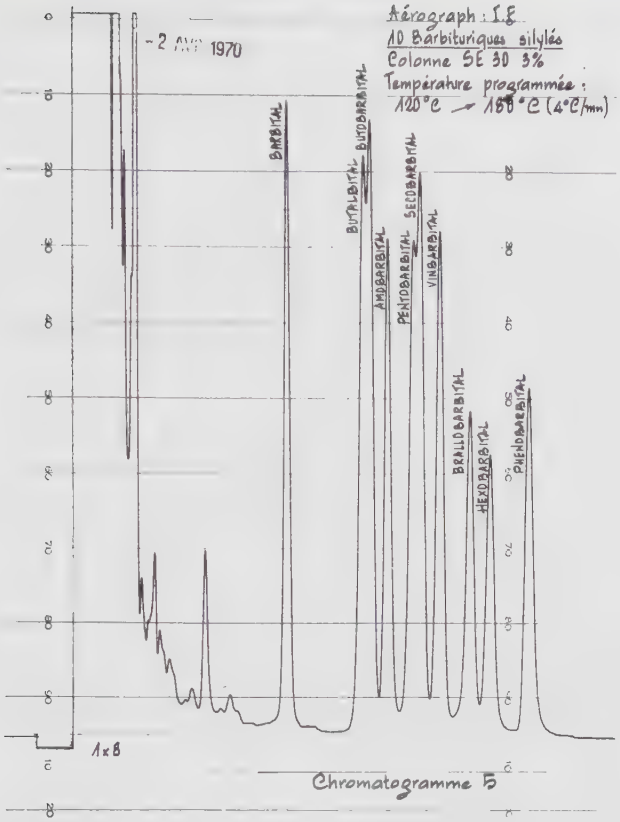
b) Technique de silylation .

Elle est extrêmement simple puisqu'il suffit de reprendre le résidu d'évaporation de l'éther par 50 µl de réactif . Après solubilisation , on injecte 1 µl dans le chromatographe, la réaction de silylation s'effectue au niveau de l'injecteur .

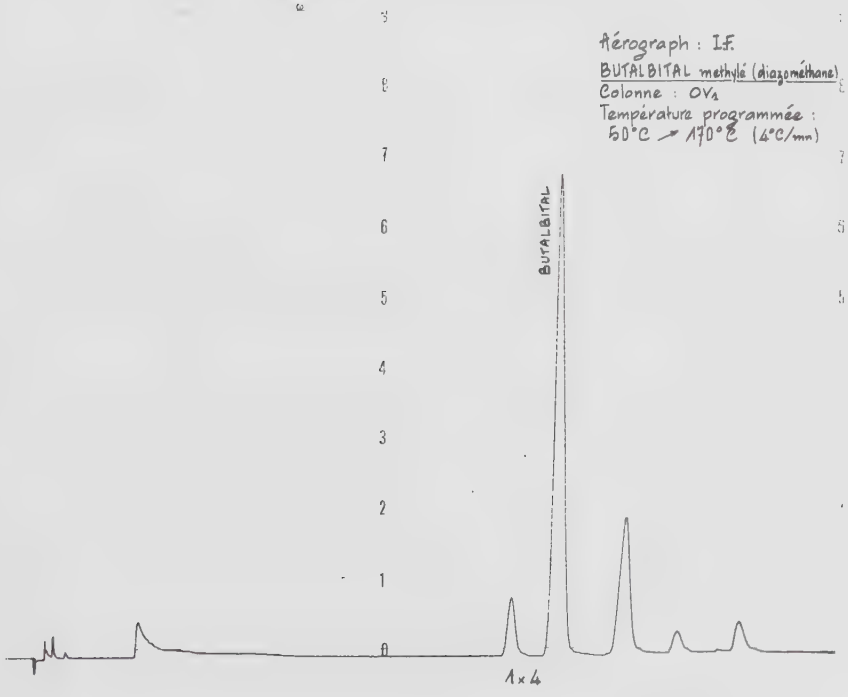
Les résultats obtenus (chromatogramme 5) seraient satisfaisants mais ne sont pas toujours parfaitement reproductibles : la silylation ne semble pas complète dans tous les cas, si bien que cette méthode ne se prête pas à un dosage . De plus, nous n'avons trouvé qu'un seul type de phase stationnaire (SE 30 à 3 p. 100) susceptible de donner une bonne séparation des différents barbituriques silylés . Or, il est nécessaire d'utiliser au moins deux types de colonnes, de polarités différentes, pour une identification sûre . Dans ces conditions, nous n'avons pas retenu la méthode de silylation qui, cependant, pourrait contribuer à une identification approximative et qui a l'avantage de sa rapidité d'exécution .

2°- Substitution par des groupements méthyle .

Plusieurs réactifs de méthylation sont utilisables :

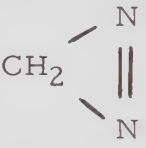


Chromatogramme 5



Chromatogramme 6

- le diazométhane,
- les hydroxydes d'ammonium quaternaires,
  . hydroxyde de tétraméthylammonium
  . hydroxyde de triméthylanilinium
- le sulfate diméthylique .

a) Méthylation par le diazométhane 

COOK, RILEY, NUNN et BUDGEN (21) décrivent une méthode qui consiste à ajouter un excès de diazométhane en solution éthérée au barbiturique sous forme acide . La méthylation s'effectue durant une nuit à la température ambiante .

Cette méthode est beaucoup trop longue pour être utilisable . Nous avons essayé une technique différente utilisant un barbotage du diazométhane dans une solution éthérée du barbiturique .

Le diazométhane est préparé par action d'une solution aqueuse de KOH à 60 p. 100 sur la N-méthyl-n-nitroso-p-toluène-sulfonamide en présence de carbitol et d'éther .

Le dispositif employé pour la préparation comporte cinq flacons laveurs disposés à la suite les uns des autres et dans lesquels on fait barboter bulle à bulle de l'azote destiné à entraîner le diazométhane formé .

- le flacon n°1 constitue le flacon de garde .
- le flacon n°2 contient de l'éther desséché sur chlorure de calcium .
- dans le flacon n°3 se forme le diazométhane à partir du mélange suivant :
  . N-méthyl-n-nitroso-p-toluène-sulfonamide 0,2g
  . KOH 60 p. 100 ..... 1,5ml
  . Carbitol 1,5ml
  . Ether ..... 4 ml

- le flacon n°4 contient le barbiturique à méthyler en solution dans 1,6 ml d'éther et 0,4 ml de méthanol .
- le flacon n°5 contient de l'éther destiné à retenir l'excès de diazométhane .

Cette méthode a donné de très bons résultats pour la plupart des barbituriques . Malheureusement le chromatogramme obtenu à partir du butalbital ainsi méthylé présente plusieurs pics que nous n'avons pas identifiés (chromatogramme n°6) . La présence dans la molécule d'un groupement allyle entraîne peut-être la formation de dérivés d'addition .

Ainsi n'avons-nous pas pu retenir cette méthode, bon nombre d'intoxications étant dues au butalbital.

b) Méthylation par les hydroxydes d'ammonium quaternaire .

Nous avons étudié la méthylation par l'hydroxyde de triméthylanilinium selon la technique de Brochmann-Hanssen et collaborateurs (17) .

- Préparation du réactif :

On prépare tout d'abord l'iodure de triméthylanilinium par action d'une mole de diméthylaniline en solution dans l'acétate d'éthyle sur 1,2 mole d'iodure de méthyle , à la température ambiante .

Le produit cristallisé obtenu est filtré et purifié par cristallisation dans l'alcool absolu .

On prépare une solution 0,1 M d'hydroxyde de triméthylanilinium en dissolvant 263 mg d'iodure dans 10 ml de méthanol et en ajoutant 175 mg d'oxyde d'argent . Le mélange est agité pendant 30 minutes . On vérifie la disparition de l'iodure de triméthylanilinium par prélèvement de quelques gouttes de réactif que l'on additionne de solution de nitrate d'argent et d'acide nitrique . Si l'on observe la formation d'un précipité , l'agitation du mélange sera poursuivie jusqu'à négativation du test . La solution est alors

filtrée sous azote et recueillie dans un flacon que l'on bouche avec un bouchon de caoutchouc préalablement bouilli dans du méthanol . Le prélèvement du réactif se fait à l'aide d'une seringue à travers le bouchon de caoutchouc .

- Technique de méthylation :

La méthylation du barbiturique a lieu, comme dans le cas de la silylation par le BSA, au niveau de l'injecteur du chromatographe .

L'extrait éthéré renfermant les différents barbituriques et contenu dans un petit tube à bouchon émeri est repris par 50 µl de réactif . Après dissolution, 1 µl de la solution est injecté dans le chromatographe . Un excès de 100 p. 100 d'hydroxyde de triméthylanilinium est indispensable pour obtenir une méthylation complète .

Les essais de méthylation effectués sur chaque barbiturique pris séparément et sur un mélange de quelques barbituriques ont donné de bons résultats . Malheureusement, avec un mélange d'un plus grand nombre de barbituriques, nous n'avons pas obtenu de résultats reproductibles, malgré un excès de réactif méthylant. Il semble que la méthylation ne soit pas complète dans tous les cas .

- La méthylation par l'hydroxyde de tétraméthylammonium a été proposée par STEVENSON (48) . Le processus est identique au précédent . Considérant les critiques exprimées par certains auteurs, concernant le manque de reproductibilité du procédé, nous n'avons pas cru bon de l'expérimenter .

c) Méthylation par le sulfate diméthylique .

Nous avons choisi la technique décrite par MARTIN et DRISCOLL (37) . La méthylation est réalisée par le sulfate diméthylique en présence de méthanol et en milieu alcalin .

- Réactifs :

. Sulfate diméthylique
. Solution méthanolique saturée en K_2CO_3
  .. Méthanol 90 ml
  .. Eau distillée 10 ml
. Tampon acétate pH 6
  .. Acétate de sodium 27,2 g/l
  .. Acide acétique q.s.p. pH 6
. Hexane Merck

- Technique :

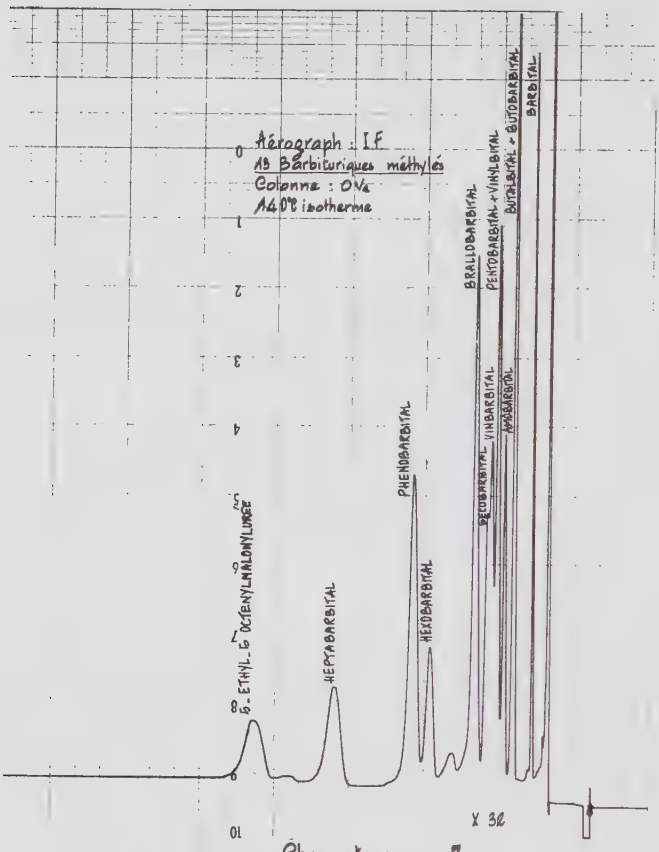
Le résidu éthéré de l'extraction des barbituriques est additionné de 2 ml de la solution méthanolique et de 0,1 ml de sulfate diméthylique . Le mélange est porté au bain-marie à 57°C ± 0,1°C pendant 4 minutes , puis le méthanol est évaporé sous vide . Après addition de 1 ml de tampon acétate, on extrait deux fois par 1 ml d'hexane .

Les phases organiques réunies sont enfin évaporées à sec et le résidu est repris par 50 µl de sulfure de carbone, 1 µl de cette solution est injecté dans le chromatographe .

C'est en définitive cette méthode de méthylation que nous avons retenue . Elle donne des résultats parfaitement reproductibles, on n'observe pas sur les chromatogrammes obtenus de pics relatifs à des barbituriques non méthylés , la méthylation s'avère totale (chromatogramme n°7) . Cette méthode a cependant l'inconvénient d'être plus longue que les précédentes puisqu'elle nécessite une deuxième extraction qui est due au fait que la méthylation se fait en milieu aqueux .

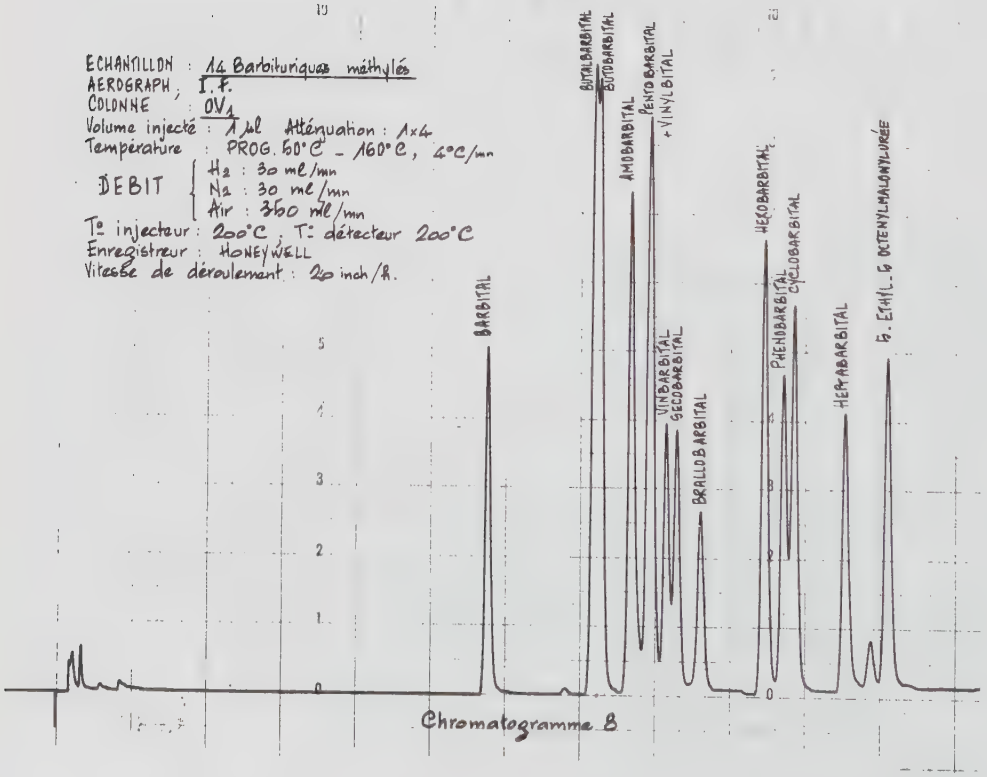
On trouvera page 117 dans le chapitre IV, l'exposé du protocole relatif aux techniques d'extraction et de méthylation utilisées maintenant au laboratoire .

Pour tenir compte des résultats observés,nous avons retenu le protocole suivant pour la préparation de l'échantillon sanguin à chromatographier :



Chromatogramme 7

ECHANTILLON : 14 Barbituriques méthylés
AEROGRAPH : I.F.
COLONNE : OV1
Volume injecté : 1 µl Atténuation : 1x4
Température : PROG. 50°C - 160°C, 4°C/mn
DEBIT { H_2 : 30 ml/mn ; N_2 : 30 ml/mn ; Air : 360 ml/mn
T° injecteur : 200°C ; T° détecteur 200°C
Enregistreur : HONEYWELL
Vitesse de déroulement : 20 inch/h.



Chromatogramme 8

- Défécation sulfotungstique ,
- Extraction par l'éther acide,
- Diminution de la polarité de la molécule par méthylation à l'aide du sulfate diméthylique .

CHAPITRE II

SEPARATION ET IDENTIFICATION DES BARBITURIQUES

I - APPAREILLAGE

Nous avons à notre disposition deux chromatographes et quatre enregistreurs .

1°- Chromatographes :

- Aérograph 1520 avec four à deux colonnes, deux détecteurs à ionisation de flamme, deux électromètres et programmateur de température .
- Girdel 75-FD-2 présentant les mêmes caractéristiques que le précédent .

2°- Enregistreurs .

- 2 Honeywell de sensibilité 1 mv pour la totalité de l'échelle (250 mm) .
- 2 Texas Instrument Servo-ritter II de sensibilité 1 mv pour la totalité de l'échelle (250 mm) .

II - CHOIX DES PHASES STATIONNAIRES

L'étude de la séparation et de l'identification des barbituriques a nécessité l'essai de différentes phases stationnaires . Nous avons choisi comme phase apolaire un polymère de diméthylsilicone, soit SE 30, soit OV 1, ces deux substances ne se différenciant que par leur degré de polymérisation . Comme phase polaire, nous avons retenu le polyéthylèneglycol 20 M et le cyanopropylphénylsilicone correspondant respectivement aux dénominations suivantes : Carbowax 20 M et OV 225 .

Les caractéristiques de ces différentes phases stationnaires sont décrites dans le tableau V où l'on trouvera également celles qui se rapportent aux phases les plus couramment employées .

III - CONDITIONS D'UTILISATION DES COLONNES - DESCRIPTION DES CHROMATOGRAMMES OBTENUS.

Pour la confection des colonnes, nous avons utilisé dans tous les cas du tube inox de 1/8 de pouce de diamètre que nous avons rempli avec le support imprégné préparé par les établissements Giravions-Dorand ou Varian Aerograph .

Les débits de gaz ont été réglés aux valeurs suivantes :

- Azote ..... 30 ml/mn
- Air ..... 400 ml/mn
- Hydrogène ..... 30 ml/mn

et les températures de l'injecteur et du détecteur maintenues à 250°C .

Dénomination des phases stationnaires	*Solvant*	*Polarité*	*Températures*	
			minimale	*maximale*
qualane	4-5 *	-	t.a.**	+150°C
piezon L	1-3	-	+50°C	+300°C
E 30 (méthyl silicone polymère)	1-3 chaud	+	+50°C	+300°C
olyéthylène glycol adipate	1-4 chaud	+++	+50°C	+200°C
E 52 (phényl silicone polymère)	1-3 chaud	+	+50°C	+300°C
GSE (néopentyl glycol sebaçate)	1-3	+++	t.a.	+225°C
EG 4000 (polyéthylène glycol)	4-6-7	++		+200°C
F1 silicone oil (fluoroalchil-xiloxane	1-2-3	++	+50°C	+250°C
PGA (néopentyl glycol adipate)	1-3	+++	+50°C	+225°C
arbowax 20M (polyéthylène glycol 20M)	1-3	+++	+50°C	+200°C
PGS (néopentyl glycol succinate)	1-3	+++	+50°C	+225°C
C 200	1-3	-		+250°C
yclohexane diméthanol succinate)	1	+++	+50°C	+210°C
piezon M	1-3	-	t.a.	+275°C
98 (huile de diméthyl silicone)	4			+250°C
FAP (free fatty acid phase)	1-3	++++	+50°C	+275°C
P 1000 (octakis (2 hydroxypropyl) sucrose)	méthanol	++++		+225°C
V1 (diméthyl silicone)	1 chaud-4	+	+50°C	+300°C
V225 (cyanopropylméthyl phényl-méthyl silicone)	1	+++	+50°C	+275°C
EGS (diéthylène glycol succinate	2-3	+++	+50°C	+220°C
E 60 (cyanoéthylméthyl silicone)	1-2-3	+++	t.a.	+240°C

* *1 = chloroforme; 2 = acétone; 3 = chlorure de méthylène ; 4 = toluène; 5 = hexane; 6 = acétate d'éthyle; 7 = H_2O .*

** *t.a. = température ambiante.*

Tableau V

Caractéristiques de quelques phases stationnaires

Nous avons préparé une solution chloroformique d'un mélange de 14 barbituriques sous forme acide. Ces 14 barbituriques ont été choisis après une étude statistique réalisée en 1969 et 1970 et portant sur la fréquence relative des différents dérivés de la malonylurée responsables d'intoxications traitées dans le Centre de Réanimation Respiratoire de Bordeaux (tableaux VI et VII) .

Nature des barbituriques	Nombre de cas	Pourcentages
sécobarbital	210	27
phénobarbital	180	23, 2
butalbital	117	15
amobarbital	109	14, 1
pentobarbital	48	6, 2
butobarbital	32	4, 1
vinbarbital	19	2, 4
barbital	16	2
cyclobarbital	11	1, 5
hexobarbital	11	1, 5
heptabarbital	9	1
brallobarbital	9	1
vinylbital	7	0, 8
5-éthyl-5-octényl-malonylurée	2	0, 2
	780	

Tableau VI

Répartition, en fonction de la nature du dérivé, des cas d'intoxication barbiturique traités au C.R.R. de Bordeaux en 1969 et 1970

- SE 30. La colonne préparée à partir de SE 30 mesure 1, 5 m de longueur .
Soumis à une programmation de température de 50 à 160°C à raison de 4°C/mn, les différents barbituriques méthylés apparaissent dans l'ordre suivant :

  barbital-butalbital et butobarbital confondus - amobarbital- pentobarbital et vinylbital confondus- vinbarbital- secobarbital- brallobarbital- hexobarbital- phénobarbital- cyclobarbital- heptabarbital- 5-éthyl-5-octénylmalonylurée .

  On constate que le butalbital et le butobarbital donnent naissance à un seul pic . Il en est de même pour le pentobarbital et le vinylbital . Le vinbarbital et le secobarbital sont mal séparés .

- OV 1 . Nous avons utilisé une colonne de même longueur que la colonne SE 30, soit 1, 5 m.
Avec des conditions de programmation identiques aux précédentes, l'ordre des barbituriques demeure inchangé, mais on obtient une meilleure séparation du vinbarbital et du sécobarbital ainsi qu'une amorce de séparation entre le butalbital et le butobarbital . Par contre le pentobarbital et le vinylbital restent confondus (chromatogramme n°8) .

C'est la colonne OV 1 que nous avons retenue et que nous utilisons comme colonne apolaire, compte-tenu des résultats légèrement meilleurs que ceux que l'on observe sur colonne SE 30 .

- Carbowax 20 M, longueur 1, 5 m . Dans les mêmes conditions de température programmée, l'ordre d'apparition des barbituriques méthylés est le suivant (chromatogramme n°9) .

  barbital- butalbital et butobarbital confondus - amobarbital- pentobarbital- secobarbital et vinylbital confondus - vinbarbital- brallobarbital- cyclobarbital- hexobarbital - heptabarbital- phénobarbital- 5-éthyl-5 octénylmalonylurée .

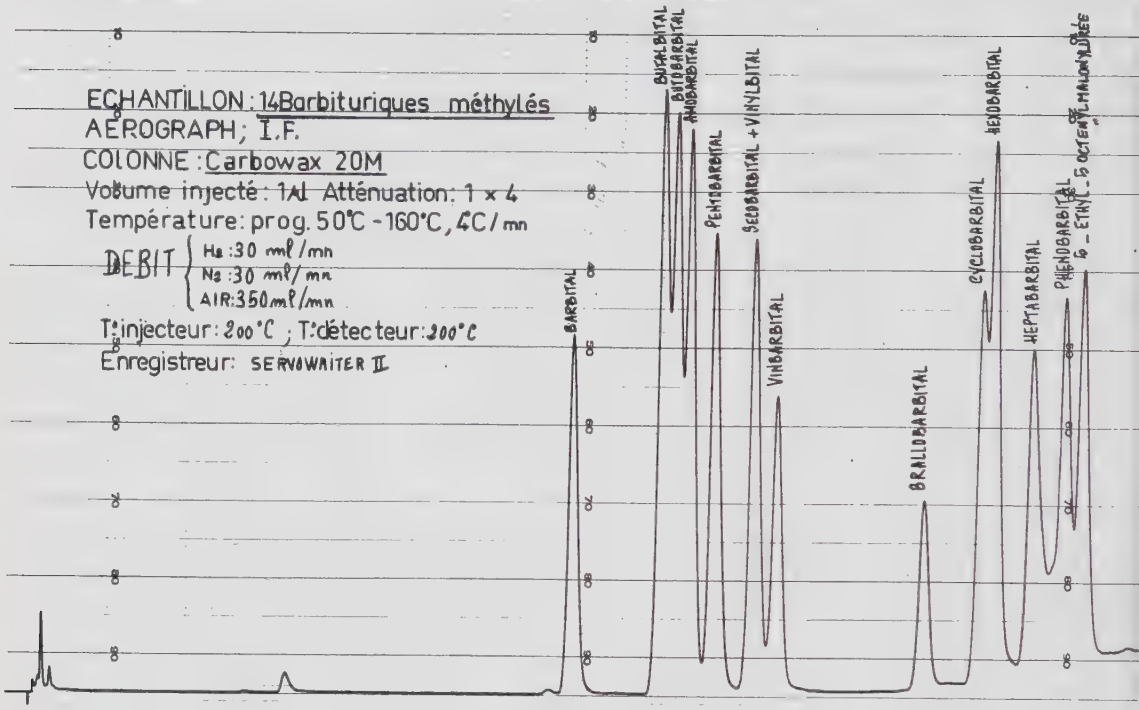
Nom commun	*NOM COMMERCIAL*		*Substituants de l'acide barbiturique* 5	5'
SECOBARBITAL	Binoctal (composant) Insomnyl Supponoctal Immenoctal Reposal (composant	Dinoctin Vespérax (composant) Sonuctane Noctadiol	allyl	(méthyl 1) butyl
PHENOBARBITAL	Phénobarbital Somnicones Alepsal Gardénal	Plexonal Sopor Epanal Hypnopax	éthyl	phényl
BUTALBITAL	Pléxonal	Optalidon (composant)	allyl	isobutyl
AMOBARBITAL	Amopax Eunoctal Supponoctal	Binoctal Noctadiol Amobarbital Métadier	éthyl	isopentyl
PENTOBARBITAL ou MEBUBARBITAL	Sédanox Nembutal	Barbigan	éthyl	(méthyl 1) butyl
BUTOBARBITAL	Hypnasmine Somnicones	Sonéryl Supponéryl	butyl	éthyl

Nom commun	*NOM COMMERCIAL*		*Substituants de l'acide barbiturique* 5	5'
VINBARBITAL	Sonuctane		éthyl	(méthyl 1) butène 1 yl
BARBITAL	Véronal Neurinase Somnothyril	Béatal Plexonal Sopor	éthyl	éthyl
CYCLOBARBITAL	Dormopan (composant)	Suppo-Dormopan (composant)	éthyl	cyclohexène 1 yl
HEXOBARBITAL	Dormopan (composant) Noctivane	Suppo-Dormopan (composant)	diméthyl 1 - 5	cyclohexène 1 yl
HEPTABARBITAL	Médomine		éthyl	cycloheptène 1 yl
BRALLOBARBITAL	Vespérone	Vespérax (composant)	allyl	bromo 2 allyl
VINYLBITAL	Optanox	Suppotanox	(méthyl 1) butyl	vinyl
5 - éthyl - 5 (bicyclo (3,2,1) octényl) malonylurée	Reposal (composant)		éthyl	bicyclo (3,2,1) octényl

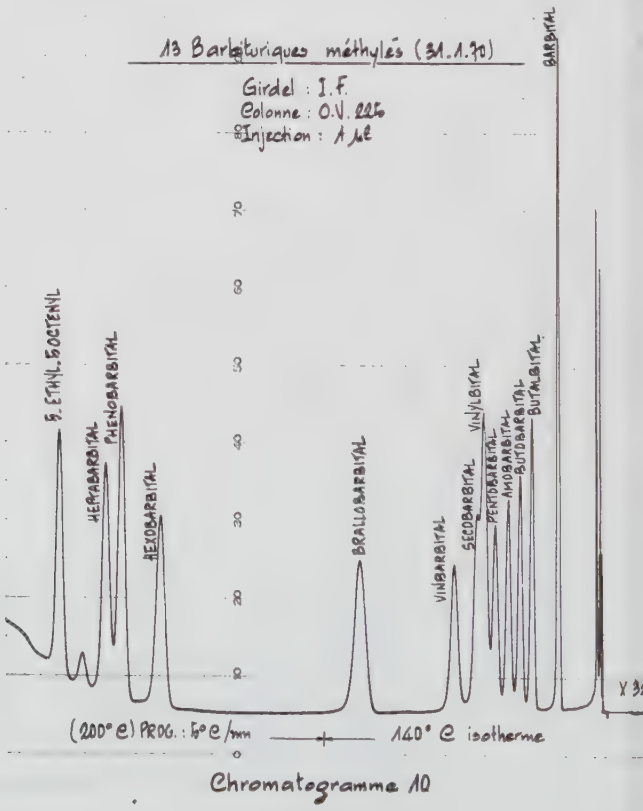
Tableau VII

Formules chimiques, noms communs, noms commerciaux des 14 barbituriques

ECHANTILLON : 14 Barbituriques méthylés
AEROGRAPH ; I.F.
COLONNE : Carbowax 20M
Volume injecté : 1 Al Atténuation : 1 x 4
Température : prog. 50°C - 160°C, 4C / mn
DEBIT { H₂ : 30 ml/mn ; N₂ : 30 ml/mn ; AIR : 350 ml/mn
T° injecteur : 200°C ; T° détecteur : 200°C
Enregistreur : SERVOWRITER II



Chromatogramme 9



Chromatogramme 10

La comparaison entre les chromatogrammes obtenus sur colonne apolaire (OV 1) et polaire (Carbowax 20 M) montre que l'ordre d'apparition des pics de barbituriques méthylés est, pour deux d'entre eux, modifié. Tandis que sur OV 1 le vinbarbital précède le sécobarbital c'est l'inverse qui se produit sur Carbowax 20 M. Les temps de rétention relatifs des barbituriques par rapport au brallobarbital sont nettement différents (Tableau VIII)

Barbituriques méthylés	Carbowax 20 M	OV 1
barbital	0,602	0,663
butalbital	0,705	0,831
butobarbital	0,719	0,841
amobarbital	0,737	0,887
pentobarbital	0,765	0,920
secobarbital	0,812	0,962
vinylbital	0,812	0,920
vinbarbital	0,836	0,943
cyclobarbital	1,07	1,15
hexobarbital	1,08	1,10
heptabarbital	1,12	1,23
phenobarbital	1,16	1,13
5-éthyl-5-octényl-malonylurée	1,18	1,29

Tableau VIII

Indices de rétention relatifs de 13 barbituriques méthylés sur colonnes OV1 et Carbowax 20 M (Référence : Brallobarbital méthylé) Programmation de température = 5°C/mn

- OV 225, longueur 2 m.

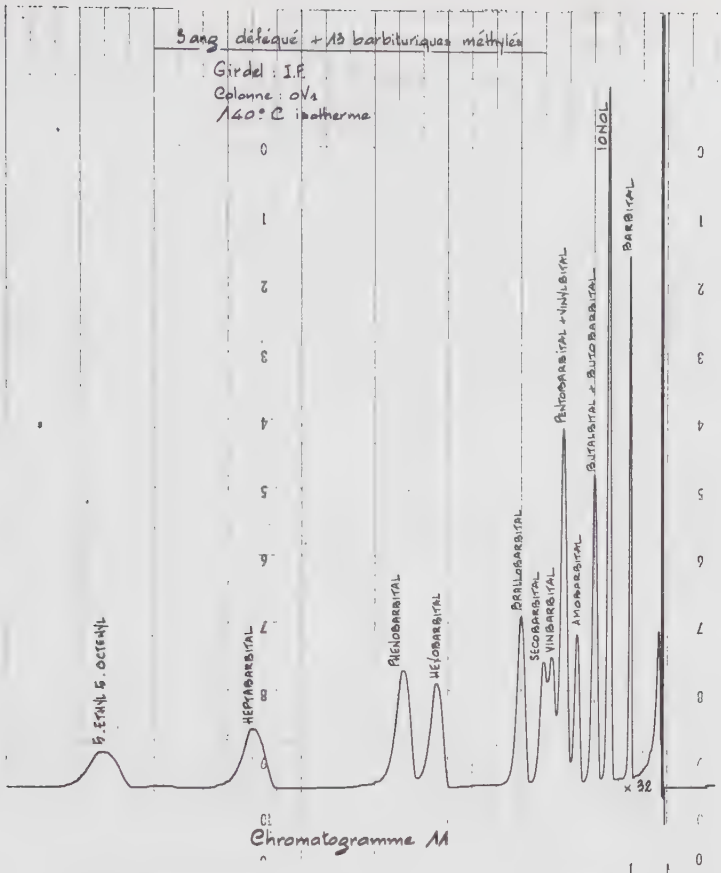
En température programmée de 50 à 180°C, à raison de 5°C/mn l'ordre de passage des différents barbituriques méthylés est identique à celui que l'on observe sur Carbowax 20 M, autre colonne polaire . Alors que sur colonne apolaire il n'était pas possible de séparer butalbital- butobarbital d'une part, pentobarbital - vinylbital d'autre part, l'utilisation de la colonne OV 225 permet une séparation excellente du premier couple et satisfaisante du second . La séparation du sécobarbital et du vinbarbital est également très bonne .

Afin d'écourter la durée de l'analyse, on peut utiliser une programmation différente : dans un premier temps une température constante à 140°C , puis une programmation de 5°C/mn dès l'élution du brallobarbital achevée (chromatogramme n°10) .

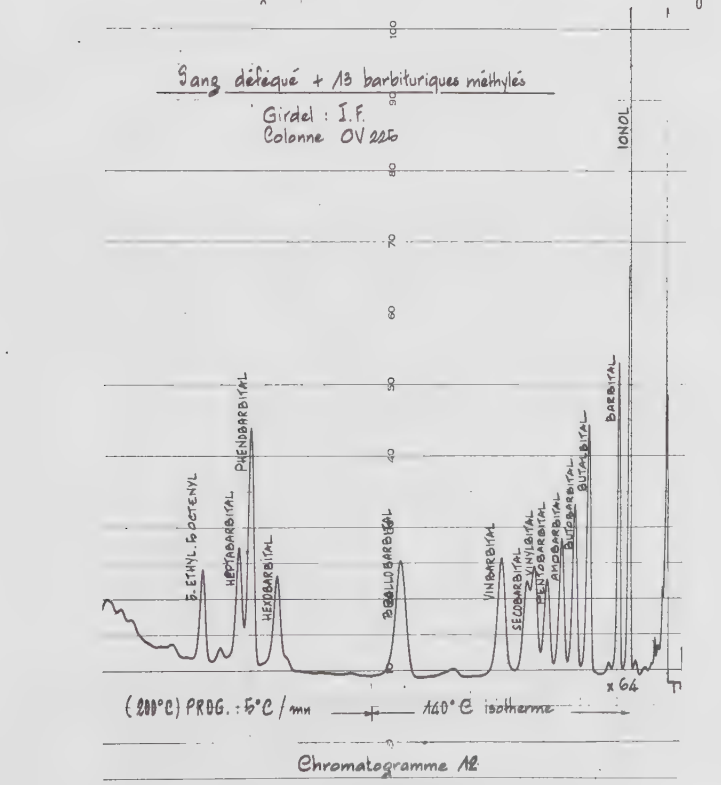
En définitive, compte tenu des résultats acquis, nous avons retenu les deux colonnes OV 1 et OV 225 dont l'utilisation simultanée permet une séparation des 14 barbituriques . De plus, sur ces deux colonnes, le pic C n'interfère avec aucun des barbituriques, comme le montrent les chromatogrammes n°11 et 12 qui ont été établis à partir d'un sang témoin auquel on a incorporé 13 barbituriques et que l'on a chromatographié respectivement sur OV 1 à 140°C et sur OV 225 à 140°C suivi d'une programmation . On y voit que le pic C se distingue très nettement des pics des barbituriques .

Afin d'utiliser ces deux colonnes à leur optimum d'efficacité, nous avons établi expérimentalement à 140°C les courbes représentatives de l'équation de Van DEEMTER qui donnent le nombre de plateaux théoriques en fonction du débit de gaz vecteur (figures n°5 et 6) . Les courbes ont été tracées pour le brallobarbital, barbiturique que nous avons choisi comme étalon interne . Les raisons de ce choix seront données ultérieurement (page 99) .

Cependant, pour avoir un temps d'analyse compatible avec la clinique, nous ne fixons pas les débits aux maxima d'efficacité, mais à 28 ml/mn pour l'OV1 et 25 ml/mn pour l'OV 225 .



Chromatogramme 11



Chromatogramme 12

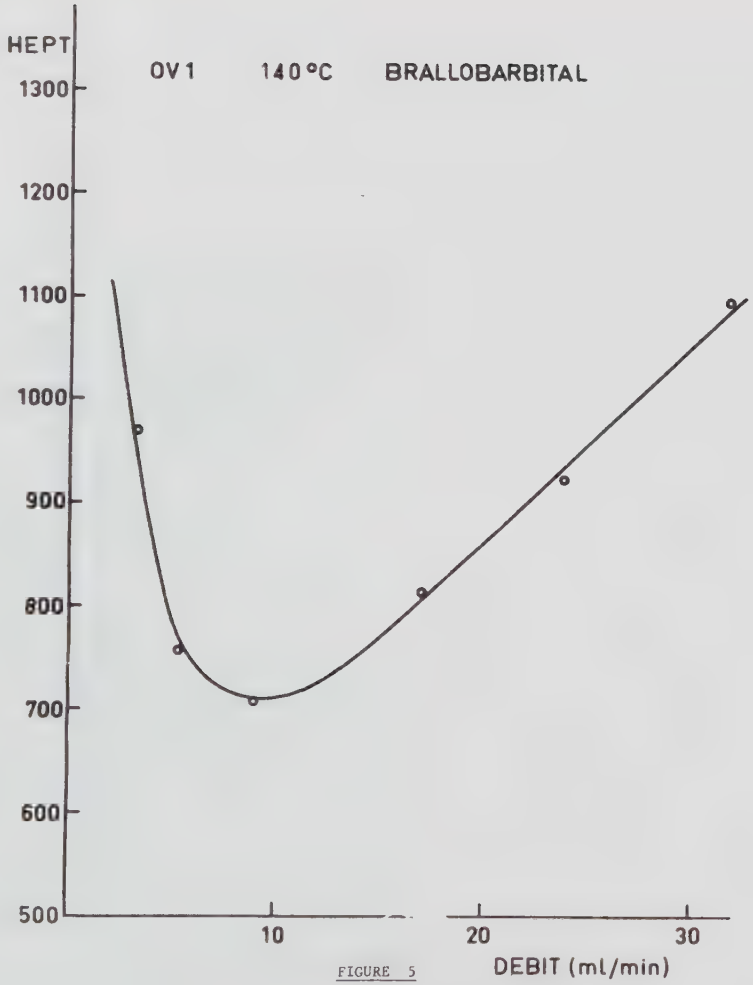


FIGURE 5

Courbe représentative de l'équation de Van Deemter
(courbe expérimentale pour le brallobarbital
Colonne OV_1 - Température 140° C)

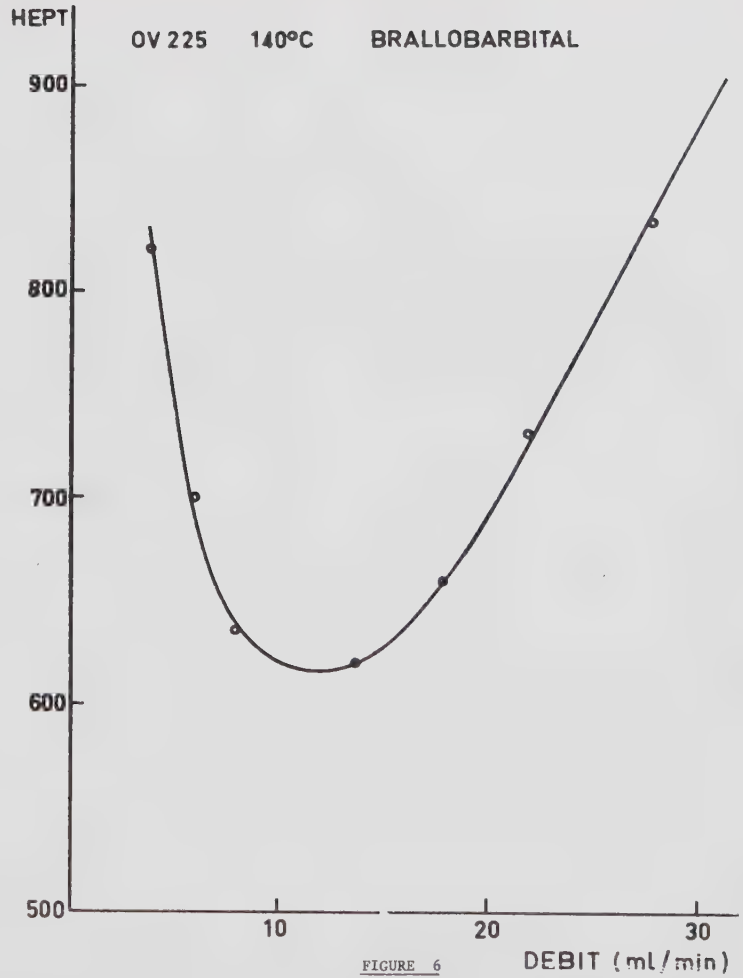


FIGURE 6

Courbe représentative de l'équation de Van Deemter
(courbe expérimentale pour le brallobarbital
Colonne OV_{225} - Température 140° C)

Le chromatographe Girdel comportant des indicateurs de perte de charge , nous avons dressé les courbes des figures n° 7 et 8 qui donnent, pour une température donnée, les valeurs du débit du gaz vecteur en fonction de la perte de charge à l'entrée de la colonne .

IV - METHODES D'IDENTIFICATION .

1°- Mesure des indices de rétention relatifs .

Cette méthode n'est valable que pour une chromatographie réalisée à température constante car la programmation de température est difficilement reproductible.

Ainsi que nous l'avons dit précédemment, nous avons choisi l'un des barbituriques le brallobarbital, comme élément de référence .

Les valeurs des différents indices de rétention par rapport à ce dérivé, colonne OV 1 et OV 225 à une température de 140°C, figurent dans le tableau IX . Mais l'identification par la mesure des indices de rétention relatifs présente une approximation d'autant moins satisfaisante que les valeurs des temps de rétention du composé à identifier diffèrent davantage de celles de l'élément de référence .

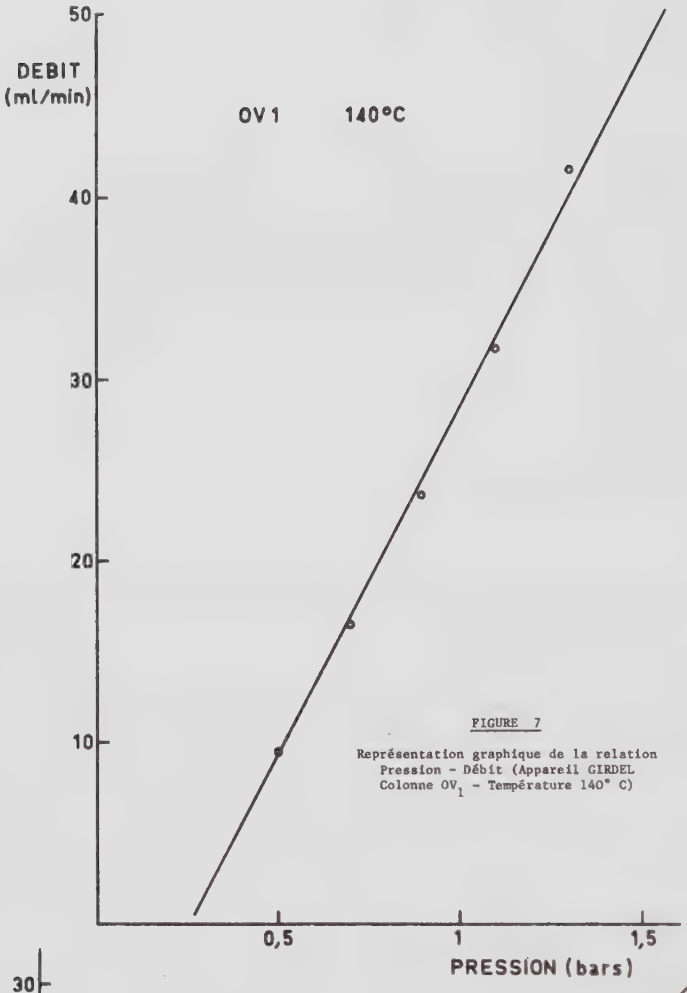


FIGURE 7

Représentation graphique de la relation Pression - Débit (Appareil GIRDEL Colonne OV_1 - Température 140° C)

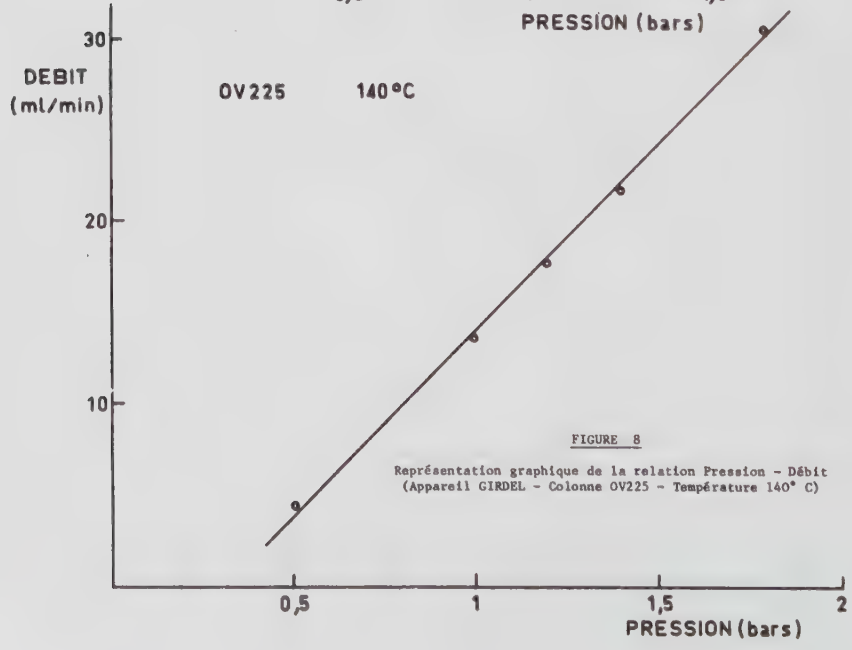


FIGURE 8

Représentation graphique de la relation Pression - Débit (Appareil GIRDEL - Colonne OV225 - Température 140° C)

Barbituriques méthylés	OV 1	OV 225
barbital	0,23	0,19
butalbital	0,48	0,31
butobarbital	0,48	0,36
amobarbital	0,60	0,41
pentobarbital	0,69	0,46
vinbarbital	0,78	0,63
vinylbital	0,69	0,50
secobarbital	0,83	0,53
hexobarbital	1,61	2,03
phénobarbital	1,83	2,42
cyclobarbital	1,94	1,93
heptabarbital	2,88	2,70
5-éthyl-5-octényl malonylurée	3,98	3,74

Tableau IX

Indices de rétention relatifs de 13 barbituriques méthylés sur colonnes OV 1 et OV 225
(Référence : Brallobarbital méthylé)
Température : 140° C isotherme

2°-Mesure des indices de Kovats .

Nous avons également déterminé les indices de Kovats sur colonnes OV1 et OV225 à 140°C des 13 barbituriques méthylés. Les résultats sont rassemblés dans le tableau X, où nous avons en outre fait figurer les incréments d'indices entre la phase polaire OV225 et la phase apolaire OV1 .

Barbituriques méthylés	OV 1	OV 225	Incréments d'indice
barbital	1400	-	
butalbital	1556	1809	253
butobarbital	1556	1828	272
amobarbital	1618	1842	224
pentobarbital	1635	1856	221
vinylbital	1635	1866	231
vinbarbital	1655	1892	237
secobarbital	1665	1873	208
brallobarbital	1700	1946	246
hexobarbital	1800	2059	259
phénobarbital	1820	2100	280
heptabarbital	1900	2125	225
5-éthyl-5-octényl-malonylurée	1990	2200	210

Tableau X

Indices de Kovats sur colonnes OV 1 et OV 225 et incréments d'indice relatifs à 13 barbituriques méthylés

3°- Méthode de surcharge .

La mesure des indices de rétention relatifs réalisée sur OV 1 et OV 225 en température isotherme fournit déjà une indication sur la nature du barbiturique décelé . Cependant, pour confirmer l'identification , nous préférons avoir recours à une méthode de surcharge puisque

nous possédons les éléments de référence et que nous nous bornons à la recherche des 14 barbituriques que nous avons définis . Pour cela, nous avons préparé un mélange de 14 barbituriques que nous avons méthylés globalement . Ce mélange est mis en solution dans le sulfure de carbone et conservé à + 4°C . L'injection de 1 µl de ce mélange fournit un chromatogramme qui, pour une température donnée, présente un profil caractéristique . En particulier les hauteurs relatives des différents pics sont constantes . La surcharge de ce mélange, par un échantillon contenant un ou plusieurs barbituriques se traduira par une augmentation relative d'un ou de plusieurs pics .

Cette méthode de surcharge est pratique et sûre ; c'est la méthode que nous utilisons et dont nous donnerons quelques exemples dans le paragraphe : applications cliniques (page n°133) .

4°- Couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse.

Si l'identification d'un barbiturique faisant partie des 14 composés étudiés ne présente plus pour nous de difficultés, il n'en est pas de même quand se présente un pic non superposable à l'un de ces 14 barbituriques . Il faut alors avoir recours à d'autres techniques que la chromatographie . Parmi celles-ci, la spectrométrie de masse est une technique de choix car elle se prête à un couplage avec la chromatographie en phase gazeuse . Nous décrirons ultérieurement dans quelles conditions nous y avons eu recours .

Quoi qu'il en soit, dans la majorité des cas, la séparation et l'identification des barbituriques par chromatographie en phase gazeuse est réalisée de façon satisfaisante par l'emploi de deux colonnes :

- une colonne apolaire OV 1 et calcul des indices de rétention relatifs .

- une colonne polaire OV 225 et utilisation de la méthode de surcharge .

Nous allons envisager dans le chapitre suivant le dosage des barbituriques ainsi identifiés .

CHAPITRE III
DOSAGE DES BARBITURIQUES

I - CHOIX DE L'ETALON INTERNE .

Nous avons choisi d'utiliser un étalon interne dans le but de diminuer les erreurs dues à une extraction non parfaitement reproductible . Celui-ci est lui-même un barbiturique et nous l'introduisons en quantité connue dans le sang à analyser . Dans ces conditions, il subit les mêmes traitements que les barbituriques éventuellement présents . Il suffit alors d'établir une fois pour toutes les rapports de proportionnalité entre les différents barbituriques et l'étalon interne et de s'assurer de la précision et de la constance de la valeur de ces rapports dans différentes conditions expérimentales, ainsi que nous l'avons réalisé .

L'étude statistique des cas d'intoxications volontaires dues aux barbituriques relevés au C. R. R. au cours des deux dernières années (tableau VI page 84) nous a montré que le barbital, l'hexobarbital, le brallobarbital étaient parmi ceux qui se rencontraient très rarement . Notre choix s'est tout d'abord porté sur le barbital et l'hexobarbital dont les pics, dans nos conditions expérimentales, ont l'avantage d'encadrer ceux du groupe des barbituriques rencontrés le plus fréquemment . Cependant nous n'avons pu retenir ces dérivés pour les raisons suivantes :

- les valeurs des coefficients de proportionnalité établies avec le barbital se sont montrées très inconstantes . Ceci doit être dû à la volatilité du dérivé diméthylé, volatilité attestée par un temps de rétention très court sur les colonnes apolaires . Ainsi, une partie du barbital diméthylé doit s'éliminer au cours de l'évaporation sous vide de l' hexane .

- l'hexobarbital se sépare incomplètement du phénobarbital .

C'est sur le brallobarbital que notre choix s'est donc arrêté car ce produit s'est finalement révélé être le meilleur étalon interne .

II - DETERMINATION DES RAPPORTS DE PROPORTIONNALITE .

Avant de procéder à la détermination des rapports de proportionnalité des différents barbituriques introduits dans du sang, nous avons mesuré ces mêmes rapports pour quelques barbituriques , en partant de solutions chloroformiques pures , évaporées, méthylées et injectées dans le chromatographe, ceci afin de nous assurer que la méthylation et la technique chromatographique donnent des résultats reproductibles .

1°- Détermination des rapports à partir des solutions pures .

a) Technique :

La détermination de tous les rapports ne peut se faire avec une seule solution du fait de la séparation

incomplète de certains barbituriques . A partir de leurs dérivés sous forme acide, nous avons donc préparé les solutions chloroformiques suivantes dont la conservation à + 4°C est parfaite . Elles servirent également à la détermination des rapports de proportionnalité établis à partir du sang .

Solution (1) à 75 mg de chacun des 5 barbituriques suivants dans 100 ml de chloroforme Merck .

- barbital
- butalbital
- amobarbital
- vinbarbital
- phénobarbital .

Solution (2) à 75 mg de chacun des 5 barbituriques suivants dans 100 ml de chloroforme :

- barbital
- butobarbital
- pentobarbital
- secobarbital
- phenobarbital .

Solution (3) à 75 mg de chacun des 4 barbituriques suivants dans 100 ml de chloroforme :

- hexobarbital
- heptabarbital
- vinylbital
- 5 éthyl-5-octényl-malonylurée .

Solution (4) à 150 mg de brallobarbital pour 100 ml de chloroforme . Cette solution est à une concentration double pour tenir compte des hauteurs relatives des différents pics et obtenir des valeurs des rapports de proportionnalité comprises entre 0, 30 et 1, 50 .

On dilue au dixième 1 ml de chaque solution et dans 3 ballons de 50 ml à col rodé, on effectue les mélanges suivants :

	A	B	C
Solution (1) 1/10	1 ml		
Solution (2) 1/10		1 ml	
Solution (3) 1/10			1 ml
Solution (4) 1/10	1 ml	1 ml	1 ml

Chacune des solutions A, B, C, est évaporée à sec et l'on procède alors à la méthylation selon la technique décrite page 118 .

Les résidus repris par 50 µl de sulfure de carbone contiennent donc 75 µg de chaque barbiturique et 150 µg de brallobarbital soit, par microlitre respectivement , 1, 5 et 3 µg .

On mesure les hauteurs des différents pics enregistrés . Nous avons en effet constaté que, du fait de l'étroitesse et de la bonne séparation des pics, cette mesure donnait des résultats proportionnels à ceux obtenus par la mesure des surfaces .

b) Résultats :

Pour un certain nombre de barbituriques, nous avons déterminé la valeur du rapport de proportionnalité R :

$$R = \frac{\text{Hauteur du pic du barbiturique}}{\text{Hauteur du pic du brallobarbital}}$$

Le tableau XI rassemble les valeurs de ces rapports :

butalbital	1,50
butobarbital	1,40
amobarbital	1,11
pentobarbital	0,87
secobarbital	0,80
vinbarbital	0,89
phenobarbital	0,43

Tableau XI

Rapports de proportionnalité de 7 barbituriques méthylés (solution pure)
Référence : Brallobarbital méthylé

- Pour le barbital, nous avons constaté une valeur du rapport de proportionnalité extrêmement variable . On ne pourra donc pas valablement doser ce barbiturique par notre méthode, seule une identification sera possible. En fait, le barbital a pratiquement disparu de l'arsenal thérapeutique et ne risque donc plus d'être cause d'intoxications .

- Les valeurs des rapports de proportionnalité représentent une moyenne obtenue à partir d'un certain nombre de mesures, plusieurs échantillons d'un même mélange chloroformique ayant été traités et chaque solution finale dans le sulfure de carbone chromatographiée plusieurs fois .

- Pour quelques barbituriques choisis arbitrairement, nous avons calculé les rapports de proportionnalité sur un grand nombre d'échantillons . L'étude statistique nous a permis d'évaluer la précision de la détermination de ces rapports, les résultats sont exprimés dans le tableau XII .

- Nous avons voulu nous assurer qu'une variation de température ou de débit n'influait pas sur la valeur de ces rapports . Pour celà , à partir d'une même solution, nous avons procédé à leur mesure dans des conditions de température et de débit variables .

	Températures	Débits
1	140° C	30 ml/mn
2	130° C	30 ml/mn
3	140° C	15 ml/mn

Pour chacune de ces trois conditions, nous avons procédé à 20 injections . L'étude statistique des résultats est reproduite dans le tableau XII .

Température débit	140°C 30 ml/mn			140° C 15 ml/mn			130° C 30 ml/mn		
	n	$\bar{x}$	σ	n	$\bar{x}$	σ	n	$\bar{x}$	σ
Phénobarbital	20	0,44	± 0,02	21	0,44	± 0,01	19	0,40	± 0,02
Vinbarbital	21	0,89	± 0,01	21	0,88	± 0,02	20	0,89	± 0,02
Amobarbital	21	1,10	± 0,02	21	1,09	± 0,02	20	1,13	± 0,04
Butalbital	16	1,50	± 0,03	19	1,49	± 0,03	16	1,59	± 0,04

Comparaison des moyennes observées

	140° C Débit = 30 ml/mn et 15 ml/mn			Débit 30 ml/mn 140° C et 130° C		
	t exp.	t (Student)	d.d.l.	t exp.	t (Student)	d.d.l.
Phénobarbital	1,80	# 2	40	1,92	# 2	38
Vinbarbital	0,59		40	1,76		39
Amobarbital	0,47		40	0,92		39
Butobarbital	0,31		33	2,71		30

Tableau XII

Etude statistique des rapports de proportionnalité de 4 barbituriques méthylés (solution pure - Référence : brallobarbital méthylé) à deux températures et deux débits différents

- Le rapport de proportionnalité correspondant au phénobarbital a été calculé à partir des résultats obtenus avec les solutions 1 et 2 . Il est de 0, 39 dans les deux cas. La nature des barbituriques présents dans le mélange est donc sans influence sur la valeur de ces rapports .

De l'examen de ces différents résultats, on peut conclure que les valeurs des rapports de proportionnalité peuvent être connues avec une précision suffisante du fait d'une bonne reproductibilité tant du procédé de méthylation que de l'analyse chromatographique .

2°- Détermination des rapports de proportionnalité à partir de sang chargé en barbituriques .

a) Technique :

Nous avons utilisé les solutions chloroformiques dont les préparations sont décrites page 101. Pour assurer une bonne solubilité des barbituriques en milieu aqueux, nous les avons transformés en leur forme saline. Nous aurions pu préparer directement les solutions aqueuses des dérivés sodiques fournis par les laboratoires pharmaceutiques et les ajouter au sang . Mais ces solutions aqueuses ne sont pas stables . Il n'en est pas de même des solutions chloroformiques des formes acides qui se conservent mieux, à + 4°C .

La technique utilisée est la suivante :

- Dans trois tubes à hémolyse A, B,C, effectuer les mélanges suivants :

	A	B	C
Solution (1)	1 ml	-	-
Solution (2)	-	1 ml	-
Solution (3)	-	-	1 ml
Solution (4)	1 ml	1 ml	1 ml
évaporer, ajouter :			
Soude 0,1 N	1 ml	1 ml	1 ml
Eau distillée	4 ml	4 ml	4 ml

- Dans trois tubes à centrifuger, mesurer :

Sang	3 ml	3 ml	3 ml
Solution A	0,5ml	-	-
Solution B	-	0,5ml	-
Solution C	-	-	0,5ml

Chaque échantillon sanguin contient ainsi 50mg par litre de brallobarbital et :

- l'échantillon A 25 mg/l des barbituriques suivants : barbital, butalbital, amobarbital, vinbarbital et phénobarbital .
- l'échantillon B 25 mg/l des barbituriques suivants : barbital, butabarbital, pentobarbital, secobarbital et phénobarbital .
- l'échantillon C 25 mg/l des barbituriques suivants : hexobarbital, heptabarbital, vinylbital et 5-éthyl-5-octényl-malonylurée .

- Les 3 échantillons sont alors soumis à une défécation, une extraction et une méthylation selon la technique décrite page 118 . Un échantillon de sang témoin n'ayant pas reçu de barbiturique est également traité de manière identique afin de s'assurer qu'aucun pic parasite ne se superposera à celui d'un barbiturique .

- Chaque résidu de l'évaporation de l'hexane est repris par 50 µl de sulfure de carbone et est ainsi prêt à être chromatographié .

b) Résultats .

Les valeurs moyennes des différents rapports de proportionnalité ainsi obtenues figurent dans le tableau XIII .

Pour l'heptabarbital et le 5-éthyl-5-octényl-malonylurée, nous avons mesuré les rapports de proportionnalité à 160°C afin de diminuer les temps de rétention et d'augmenter la valeur de ces rapports .

	OV 1	OV 225
butalbital	1,70	1,41
butobarbital	1,56	1,58
amobarbital	1,03	-
pentobarbital	0,87	0,99
vinbarbital	1,11	0,93
secobarbital	0,66	0,80
vinylbital	0,75	0,50
phénobarbital	0,39	-
cyclobarbital	0,40	0,42
hexobarbital	0,38	-
heptabarbital(160°C)	0,32	0,30
5-éthyl-5-octényl-malonylurée à (160°C)	0,29	-

Tableau XIII

Rapports de proportionnalité établis à 140° C pour 12 barbituriques méthylés (extraction à partir du sang) Référence = Brallobarbital méthylé

Comme pour les solutions pures, ces rapports représentent une moyenne calculée à partir d'un certain nombre d'échantillons de sang d'origine différente . Pour quelques barbituriques, nous avons procédé à une analyse statistique des résultats afin de nous assurer que le procédé d'extraction n'entraînait pas une diminution de la précision et de la reproductibilité que nous avions déjà observées à partir de solutions pures .

Les résultats sont exprimés dans le tableau XIV . Il y est clairement montré que la précision des rapports est convenable .

barbituriques	nombre d'échantillons de sang	nombre de mesures	moyenne des rapports de proportionnalité
butalbital	10	28	1,70 ± 0,09
butobarbital	16	69	1,56 ± 0,02
amobarbital	10	38	1,03 ± 0,05
pentobarbital	16	81	0,87 ± 0,01
vinbarbital	10	37	1,11 ± 0,03
secobarbital	16	86	0,66 ± 0,01
phenobarbital	16	85	0,39 ± 0,005

Tableau XIV

Etude statistique des rapports de proportionnalité de 7 barbituriques méthylés (Extraction à partir du sang) Référence = Brallobarbital méthylé

Nous avons vu que sur colonne OV 1 certains barbituriques se séparaient mal . Il en est ainsi du butalbital et du butobarbital, du pentobarbital et du vinylbital, du vinbarbital et du sécobarbital . Si de tels mélanges se rencontrent dans un échantillon sanguin, le dosage est impossible . C'est la raison pour laquelle nous avons déterminé les rapports de proportionnalité sur colonne OV 225 sur laquelle ces couples sont bien séparés (tableau XIII) .

Il restait à vérifier que ce rapport de proportionnalité établi pour des concentrations données (25 mg/l de barbiturique, 50 mg/l pour l'étalon interne) demeurait valable quelles que soient les proportions relatives du composé à doser et de l'étalon interne . Pour cela, nous avons préparé selon la technique précédemment décrite des échantillons de sang contenant 12,5 - 25 - 50- 62,5 mg/l de brallobarbital . Si l'on porte sur un graphique les valeurs des concentrations d'une part et celles des rapports de proportionnalité d'autre part, on obtient pratiquement pour chaque barbiturique une droite comme on peut le constater sur la figure n°9 .

Le calcul de la concentration en barbiturique C pour un échantillon donné sera effectué de la façon suivante :

$$C_{mg/l} = 25 \frac{X}{Y} \frac{1}{R} \quad \text{où}$$

R = rapport de proportionnalité du barbiturique identifié

X = hauteur du pic du barbiturique identifié

Y = hauteur du pic du brallobarbital .

III - PRECISION ET SPECIFICITE DE LA METHODE .

1°- Précision .

Nous avons choisi un barbiturique : le secobarbital très fréquemment rencontré dans les intoxications volontaires et que nous avons ajouté , à une concentration connue de 25 mg/l, à plusieurs échantillons de sang . Nous avons ensuite pratiqué le dosage selon la technique mise au point en utilisant la valeur du rapport de proportionnalité : 0,66 . Les résultats sont exprimés dans le tableau XV.

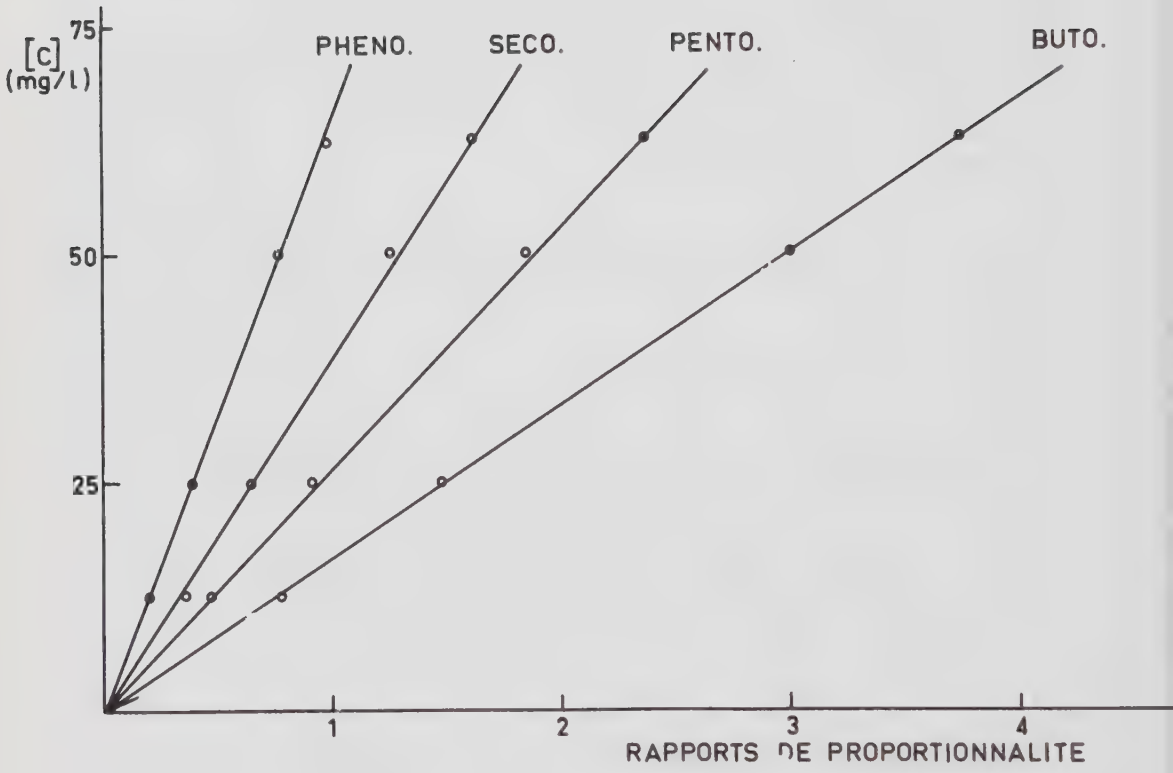


FIGURE 9

Rapports de proportionnalité à des concentrations différentes
de 5 barbituriques méthylés (solution pure)
Référence : Brallobarbital méthylé

valeur théorique	valeur trouvée	moyenne ± 1 écart-type	écart à la moyenne	pourcentage d'erreurs
	24, 68		- 0, 32	- 0, 8
	24, 21		- 0, 79	- 3, 2
	24, 94		- 0, 06	- 0, 2
	25, 12		+ 0, 12	+ 0, 5
25 mg/l	25, 93	24, 79	+ 0, 93	+ 3, 7
	25, 65	± 1, 85	+ 0, 65	+ 2, 6
	24, 30		- 0, 70	- 2, 8
	23, 43		- 1, 57	- 6
	24, 21		- 0, 79	- 3
	25, 39		+ 0, 39	+ 1, 5

Tableau XV

Taux de récupération du Sécobarbital
Etude statistique

La précision des résultats obtenus y apparaît satisfaisante .

D'autre part, on constate que le rapport de proportionnalité du sécobarbital (0, 66) établi à partir de mélanges de plusieurs barbituriques se révèle parfaitement valable pour un échantillon contenant le seul sécobarbital . Ceci confirme les constatations faites précédemment dans le cas du phénobarbital . On peut conclure que, dans un mélange de plusieurs barbituriques, chacun, au cours de la manipulation, se comporte comme s'il était seul .

2°- Spécificité de la méthode .

Il est bien certain qu'un grand nombre de substances médicamenteuses ou non sont extractibles du sang par l'éther en milieu acide . Certaines sont très proches des barbituriques par leur structure chimique et leur poids moléculaire et il est donc à craindre que de telles substances interfèrent avec ces composés .

C'est la raison pour laquelle nous avons étudié le comportement d'un certain nombre de molécules auxquelles nous avons fait subir les différentes étapes de la technique d'identification des barbituriques . Nous avons retenu les substances suivantes :

- L'acide urique qui existe normalement dans le sang à une concentration relativement importante et dont la structure chimique s'apparente à celle des barbituriques .

- Les bases xanthiques, théophylline et surtout caféine , souvent associées à d'autres médicaments dans les spécialités pharmaceutiques . Ces composés présentent également une parenté chimique avec les dérivés de la malonylurée .

- Les dérivés salicylés et notamment l'Aspirine largement utilisée et responsable de quelques intoxications .

- L'antipyrine

- Le pyramidon que l'on trouve associé au butalbital dans l'Optalidon .

- Enfin un certain nombre de drogues psychotropes, particulièrement utilisées par le public, telles le Merinax, la Glutethimide ,le N Oblivon , l'Equanil .

- La Primaclone dont la formule est très voisine de celle du phénobarbital n'a pas été retenue du fait de ses caractères d'insolubilité dans nos conditions, d'extraction .

- Les dérivés des dibenzoazépines , du cycloheptadiène (amitryptiline) et de la méthaqualone partiellement extractibles par l'éther acide, ont des temps de rétention nettement supérieurs à ceux des barbituriques .

Il est bien évident que cette liste des substances est limitée et qu'il serait souhaitable de l'étendre . Nous nous proposons de le faire ultérieurement .

Nos résultats peuvent se résumer de la façon suivante :

- Les dérivés salicylés et notamment l'Aspirine sont élués très rapidement, avant même le butalbital , et n'interfèrent donc nullement avec les barbituriques .

- L'acide urique , donne un pic qui, sur OV 1 et OV 225, est élué entre le solvant et le barbital.

- La théophylline sera transformée en caféine . Cette dernière sur OV 1 est éluée en même temps que l'hexobarbital tandis que sur OV 225 le pic qui lui correspond apparaît au-delà de la 5-éthyl-5-octényl-malonylurée .

- Le pyramidon est élué sur OV 1 entre le phénobarbital et l'heptabarbital dont il est mal séparé, mais sur OV225 l'apparition du pyramidon a lieu après celle de la 5-éthyl-5-octényl-malonylurée .

- L'antipyrine donne un pic qui émerge sur OV1, immédiatement après le phénobarbital, sur OV225 après le dernier barbiturique .

- La glutéthimide interfère avec les barbituriques . En effet, elle est éluée avec l'hexobarbital sur OV1 et avec le phénobarbital sur OV 225 .

- Le mérinax est élué, sur OV1 , entre le barbital et le couple butalbital-butobarbital, sur OV225 entre l'amobarbital et le pentobarbital .

- L'Equanil et le N Oblivon n'interfèrent pas avec les barbituriques . Ils sont élués très rapidement entre le solvant et le barbital .

Cette courte étude est particulièrement démonstrative de l'intérêt d'employer deux colonnes pour une identification sûre des barbituriques . En effet, si une substance est éluée en même temps qu'un des barbituriques sur l'une des colonnes , nous n'avons jamais constaté, au cours de notre expérimentation, que sur l'autre colonne la même éventualité se reproduise .

Ainsi la chromatographie en phase gazeuse , conduite comme nous l'avons précisé, permet non seulement d'identifier avec beaucoup de sûreté le ou les barbituriques du sang, mais aussi de doser ces substances avec une précision satisfaisante . L'intérêt de ce dosage est indéniable pour le clinicien qui pourra ainsi décider du type de traitement à mettre en œuvre lors d'une intoxication par les dérivés de la malonylurée .

CHAPITRE IV

REALISATION PRATIQUE DE L'IDENTIFICATION ET DU DOSAGE D'UN BARBITURIQUE DANS LE SANG

Ce chapitre résume les techniques de défécation, d'extraction, de méthylation et de chromatographie utilisées dans le laboratoire pour une recherche et un dosage de barbiturique .

I - OBTENTION DE L'ECHANTILLON A INJECTER DANS LE CHROMATOGRAPHE .

1°- Réactifs :

- Tungstate de sodium à 20 p. 100
- Acide sulfurique 0, 66 N
- Phosphate monosodique en solution saturée
- Ether Merck
- Sulfate diméthylique
- Solution méthanolique saturée en carbonate de potassium :
  - . Méthanol 90 p. 100
  - . Eau distillée 10 p. 100
- Tampon acétate pH 6
- Hexane
- Solution chloroformique de brallobarbital à 150 mg/100ml.

2°- Préparation de l'échantillon sanguin chargé en étalon interne.

Dans un petit tube introduire :

- solution chloroformique de brallobarbital ..... 1 ml

Evaporer à sec . Ajouter :

- soude 0, 1 N ..... 1 ml
- eau distillée ..... 4 ml

Dans un tube à centrifuger, mesurer :

- sang ..... 3 ml
- solution alcaline de brallobarbital ..... 0,5 ml

3°- Défécation .

Ajouter au sang chargé en étalon interne :

- solution de tungstate ..... 3 ml

Mélanger.

- acide sulfurique 0, 66 N ..... 5 ml

Mélanger.

Attendre 10 minutes, centrifuger 5 minutes à 3000 t/mn.

4°- Première extraction .

- liquide surnageant ..... 5 ml
- solution saturée de phosphate ..... 3 ml
- éther ..... 10 ml

Porter à l'agitateur mécanique 5 minutes .

5°- Méthylation .

Dans un ballon de 50 ml à col rodé, introduire la totalité de la phase éthérée .
Evaporer à sec au bain-marie .

Ajouter :

- solution méthanolique ..... 2 ml
- sulfate diméthylique ..... 0,1 ml

Porter au bain-marie à 57°C ± 0,1°C pendant 4 mn.
Evaporer le méthanol sous vide . Nous utilisons un évaporateur rotatif muni d'un dispositif permettant plusieurs évaporations simultanées .

6°- Deuxième extraction .

Ajouter :

- tampon acétate ..... 1 ml
- hexane ..... 1 ml

Transvaser le mélange dans un petit tube de 3ml à bouchon rodé .
Porter à l'agitateur mécanique 5 minutes .
Après décantation, prélever la phase organique et l'introduire dans un tube de 3 ml bouchant à l'émeri .
Extraire une deuxième fois la phase aqueuse par :

- Hexane ..... 1 ml

Porter à nouveau à l'agitateur mécanique 5 minutes .
Réunir les deux phases organiques et évaporer la totalité de l'hexane sous vide au bain-marie à 57°C.

II - CHROMATOGRAPHIE DE L'ECHANTILLON

1°- Obtention des chromatogrammes .

Reprendre le résidu par :

- sulfure de carbone ..... 50 µl

Après dissolution on peut procéder à l'analyse chromatographique qui s'effectue sur 1 µl de solution .

On utilise simultanément les deux colonnes OV 1 et OV 225 placées dans le four à double colonne, initialement maintenu à la température de 140°C .

- Sur colonne d'OV 1 on injecte 1 µl de solution inconnue à analyser .
- Au bout de 5 minutes, on injecte sur colonne d'OV 225 1 µl de solution inconnue surchargée par 1 µl de solution des 13 barbituriques méthylés dont on connaît au préalable le profil du chromatogramme .
- Dès que le brallobarbital est élué sur colonne OV 225, on programme la température à raison de 5°C par minute .

2°- Interprétation des résultats .

Plusieurs cas peuvent se présenter :

1er cas :

- Sur OV 225 le profil des 13 barbituriques n'est pas modifié en dehors de l'apparition du pic C et de l'augmentation du pic du brallobarbital puisque l'étalon interne est constitué par ce barbiturique .
- Sur OV 1 on n'observe aucun pic dans la zone de passage des barbituriques en dehors du pic C et du pic de brallobarbital .

Il n'y a pas de barbiturique dans le sang analysé .

2ème cas :

- Sur OV 225 on note l'augmentation d'un pic correspondant à un ou plusieurs barbituriques qui sont ainsi identifiés , l'identification devant être confirmée par les résultats obtenus sur OV 1 .
- Sur OV 1 on observe l'existence de pics dans la zone des barbituriques . La mesure des indices de rétention

relatifs par rapport à l'étalon interne confirmera l'identification déjà réalisée sur OV 225 .

- Le dosage simultané sera réalisé pour la plupart des barbituriques par mesure des hauteurs des pics . Le calcul donnera le résultat exprimé en milligrammes par litre (voir page 111) .

3ème cas :

L'identification a conduit à la présence d'heptabarbital ou de 5-éthyl-5-octényl-malonylurée . Le dosage sur OV 1 à 140°C est aléatoire, il sera préférable de pratiquer une deuxième injection sur OV 1, non plus à 140°C, mais à 160°C . On utilisera pour le calcul le rapport de proportionnalité établi dans ces nouvelles conditions opératoires .

4ème cas :

L'examen du chromatogramme obtenu sur OV 225 montre la présence soit de butalbital et de butobarbital, soit de pentobarbital et de vinylbital, soit de vinbarbital et de sécobarbital . On sait que ces couples de barbituriques sont mal séparés sur OV 1 . Un dosage n'est donc pas possible sur cette colonne . On procèdera à une nouvelle injection de l'extrait sanguin, cette fois-ci non surchargé, sur OV 225 à 140°C et le dosage sera réalisé en utilisant le rapport de proportionnalité approprié (tableau XIII) .

5ème cas :

L'utilisation de brallobarbital comme étalon interne interdit évidemment le dosage de ce barbiturique éventuellement cause d'une intoxication . L'identification demeurera naturellement possible puisqu'il suffira sur colonne OV 225 de noter une augmentation anormale du pic du brallobarbital par rapport aux autres pics pour en affirmer la présence dans l'échantillon initial . Pour en

confirmer l'identification et pratiquer le dosage, il faudra incorporer au sang un autre étalon interne, par exemple le vinbarbital .

La préparation de cet étalon interne et son incorporation au sang sont réalisées selon les modalités exposées plus haut à la différence près que la concentration de l'étalon sera de 25 mg par litre de sang et non de 50 mg comme elle l'était pour le brallobarbital.

On procèdera ensuite à l'injection de l'extrait sur colonne OV 1 à 140 °C .

Le rapport de proportionnalité du vinbarbital par rapport au brallobarbital R étant 1,11, X et Y respectivement les hauteurs des pics du brallobarbital et du vinbarbital, la concentration en barbiturique, exprimée en mg/litre sera donnée par la formule :

$$50 \cdot \frac{X}{Y} \cdot R = 50 \cdot \frac{X}{Y} \cdot 1,11$$

6ème cas :

On n'observe pas de pic correspondant à un barbiturique . Par contre, on note l'existence de pics de nature inconnue . Nous avons étudié précédemment la mise en évidence de composés médicamenteux autres que les barbituriques et susceptibles d'être extraits par l'éther en milieu acide . Certains sont en effet identifiables . Pour les autres, il faut alors avoir recours à une méthode d'identification différente . Nous avons dit que le cas s'était présenté à deux reprises et que nous avions eu recours à la spectrométrie de masse .

7ème cas :

Nous n'avons jamais eu à le résoudre . Cependant , il est possible qu'il puisse se présenter, c'est le cas où

l'on observe l'existence d'un pic pouvant être identifié à un barbiturique sur une colonne, mais dont la rétention sur l'autre colonne ne correspond pas à celle de ce barbiturique . Il peut évidemment s'agir d'un dérivé de la malonylurée ne faisant pas partie des 13 barbituriques étudiés ou bien d'un autre composé non identifiable dans ces conditions .

Signalons que la réalisation pratique de cette méthode d'identification et de dosage simultanée ne demande pas plus d'une heure et demie entre l'arrivée de l'échantillon au laboratoire et la remise des résultats au clinicien .

CHAPITRE V

UTILISATION DU COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE SPECTROMETRIE DE BASE

Ainsi que nous l'avons relaté précédemment, nous avons été amené à utiliser la spectrométrie de masse (*) couplée à la chromatographie en phase gazeuse dans deux conditions bien particulières : d'abord en vue de l'identification de pics inconnus interférant avec les barbituriques analysés en chromatographie en phase gazeuse, ensuite pour effectuer une vérification de la méthylation des barbituriques telle que nous l'avons pratiquée.

I - IDENTIFICATION DE COMPOSES INCONNUS.

Deux composés ont été identifiés :

- l'un correspond au pic C retrouvé sur tous les chromatogrammes qu'ils soient obtenus à partir de sangs normaux ou non .

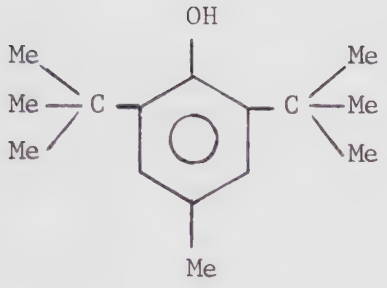
(*) *Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à M. le Professeur LALANDE, Professeur de Chimie Appliquée à la Faculté des Sciences de Bordeaux qui a tenu à notre disposition un spectromètre de masse AEI MS 12 à ionisation par bombardement électronique. Nos remerciements s'adressent également à M. Guy BOURGEOIS, Docteur ès Sciences, Ingénieur de Recherches au CNRS, qui a bien voulu établir les spectres et les analyser.*

- l'autre concerne un pic mis en évidence à deux reprises au cours des analyses pratiquées au laboratoire sur des échantillons de sang prélevés sur des malades hospitalisés au C. R. R. Dans les deux cas il ne s'agissait manifestement pas de barbiturique et la chromatographie en phase gazeuse seule ne permettait pas une identification .

1°- Identification du pic C .

- L'expérimentation portant sur les différents réactifs utilisés au cours de la préparation de l'échantillon nous a montré par élimination que ce pic C devait être rapporté à une substance contenue dans l'éther .
- l'examen du spectre de masse obtenu à la suite du couplage chromatographique mettait en évidence quelques caractéristiques particulières .
  . un pic de masse m/e = 220 ainsi que la présence de nombreux pics doublement ionisés font penser à un produit aromatique .
  . un pic de base m/e = 205 correspond au départ d'un radical méthyle à partir du pic de masse .
  . un pic m/e = 57 caractérise un ion tertiobutyle .

Ce spectre identifie le pic C du chromatogramme à l'ionol . Il s'agit d'un phénol ajouté à l'éther Merk composé probablement utilisé par le fabricant, dans le but d'empêcher la formation de peroxydes.



Cette identification a été doublement confirmée :

. en vérifiant que l'ionol pur donne le même spectre de masse ,
. par la méthode de surcharge en chromatographie en phase gazeuse .

2°- Identification d'une substance inconnue dans le sang de 2 malades .

- Nous avons trouvé dans le sang de deux malades une substance qui sur OV 1 est éluée entre le couple butal bital-butobarbital et l'amobarbital et que l'analyse chromatographique seule ne nous a pas permis d'identifier .

Certes, ce pic est dû à une substance soluble dans l'éther acide, ce qui limite le champ des recherches.

- Parmi les substances médicamenteuses, extractibles par l'éther acide et soumises à l'analyse chromatographique que nous avions étudiées au préalable (page 114) nous avions constaté qu'aucune ne présente un indice de rétention identique au composé recherché .

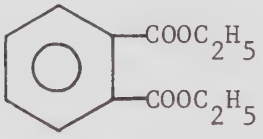
- D'autre part, parmi les médicaments entrant dans la thérapeutique de ces deux malades aucun n'était susceptible d'être confondu avec le composé inconnu, soit du fait de son insolubilité dans nos conditions opératoires, soit du fait de sa structure moléculaire incompatible avec un temps de rétention voisin de ce composé à identifier .

C'est la raison pour laquelle nous avons eu recours au spectromètre de masse .

- Le spectrogramme obtenu comporte :

. un pic de base m/e = 149 qui est dû à l'ion anhydride phtalique protoné, caractéristique des phtalates ,
. un pic m/e = 177 qui correspond au départ d'un radical $OCH_2\ CH_3$ à partir de l'ion moléculaire .

On est ainsi amené à identifier le phtalate de diéthyle, de masse 222 .



- L'identification a été doublement confirmée, comme dans le cas du composé précédent .

- La présence dans le sang de cette substance non médicamenteuse était pour le moins surprenante . Mais l'examen minutieux des observations des deux malades dans le sang desquels le phtalate de diéthyle avait été mis en évidence devait nous livrer la clef de l'énigme . . .

Ces deux patients, avant une transfusion, avaient subi une mesure de masse sanguine (Appareil Volémétron, substance traceuse : albumine humaine marquée à l'Iode ^{131}) . Le sang envoyé au laboratoire pour recherche de barbiturique était le sang témoin prélevé au cours de cette mesure de volémie dans un tube plastique livré dans la trousse fournie par le constructeur du Volemetron (Laboratoires AMES) . Ce plastique, dont le plastifiant est justement le phtalate de diéthyle est à l'origine de la présence de ce composé dans les échantillons examinés .

II - ETUDE DU SPECTRE DES BARBITURIQUES METHYLES .

- Leurs spectres de masse sont relativement délicats à interpréter car la molécule de barbiturique s'ionise et se scinde, les fragments eux-mêmes se dégradant à leur tour .

- Au cours d'un travail portant sur l'étude des spectres de substances médicamenteuses, ARNOLD et GRUTZMACHER (5) décrivent le spectre de masse du pentobarbital, il est constitué par :

- un pic moléculaire m/e = 226
- un pic m/e = 197 qui correspond au départ d'un groupement éthyle à partir du pic moléculaire .
- un pic m/e = 156 , c'est le pic de base qui correspond à la perte d'un radical C_5H_{10} selon la dégradation de Mac Lafferty (figure 10a) . Ce mode de dégradation est possible puisqu'il existe un groupe carboné attaché à un carbonyle qui contient plus de deux atomes de carbone et un hydrogène placé sur le troisième .
- un pic m/e = 141 . Ce pic est dû au départ d'un radical méthyle à partir du groupement m/e = 156 .

- Pour notre part, nous avons établi les spectres des dérivés méthylés suivants : barbital, butobarbital, pentobarbital, secobarbital, phénobarbital . Nous avons vérifié que la méthylation au sulfate diméthylique est double .

A titre d'exemple, nous décrivons le spectre du pentobarbital diméthylé (figure n°10b). Il comporte les pics suivants :

m/e = 254 - C'est le pic moléculaire , il est extrêmement réduit et témoigne de la forte dégradation du pentobarbital diméthylé .

m/e = 225 - Ce pic correspond au départ d'un radical éthyle .

m/e = 184 - C'est le pic de base, il correspond au départ d'un radical C_5H_{10} selon la dégradation de Mac Lafferty.

m/e = 183 - Ce pic correspond à la perte du radical C_5H_{11}

Le pic métastable m/e = 155, 2 est dû au départ d'un groupe méthyle à partir du groupement m/e = 184 . Il y a formation du pic 184 - 15 = 169 .

- Si l'on rapproche le spectre du pentobarbital de celui du pentobarbital diméthylé, on constate que les modes de dégradation sont similaires . On retrouve ainsi les mêmes pics décalés d'une masse C_2H_4 = 28 . Ceci est une preuve que la méthylation par le sulfate diméthylique fixe deux groupements méthyles sur la molécule barbiturique .

Le couplage spectromètre de masse - chromatographe en phase gazeuse apparaît donc extrêmement fructueux et nous nous proposons de l'employer dans un avenir rapproché pour l'étude des métabolites des barbituriques .

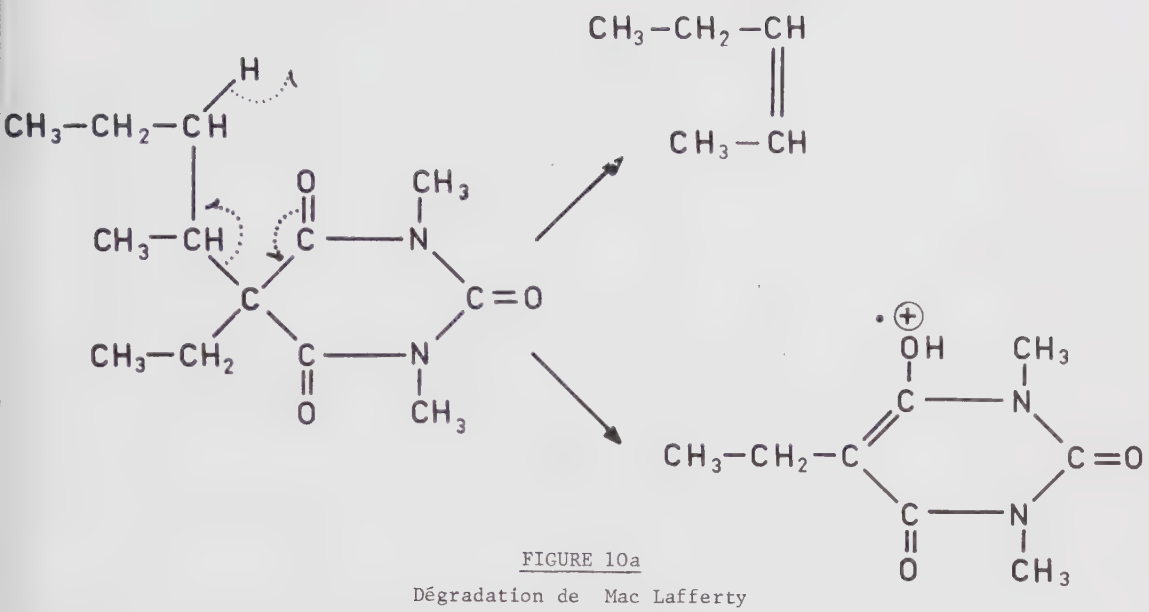


FIGURE 10a

Dégradation de Mac Lafferty

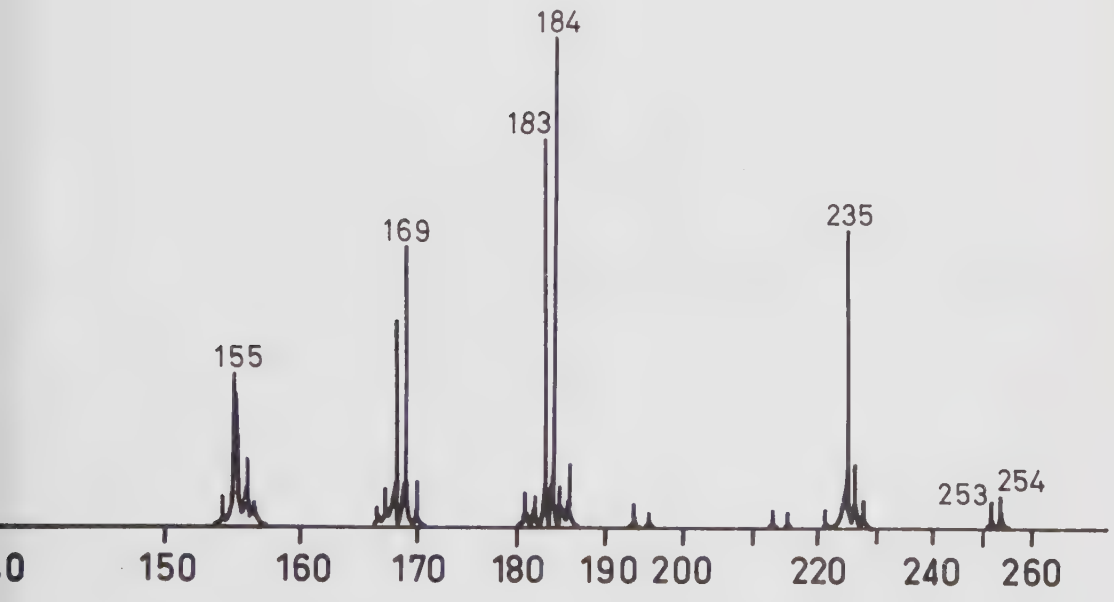


FIGURE 10b

Spectrogramme de masse du pentobarbital diméthylé

CHAPITRE VI
APPLICATIONS CLINIQUES

Nous avons eu l'occasion de pratiquer 210 analyses d'échantillons de sang de malades hospitalisés dans le service et présentant cliniquement les signes d'une intoxication .

Parmi ces examens nous avons choisi seulement trois exemples nous apparaissant particulièrement démonstratifs , les deux premiers concernent l'identification simultanée de quatre barbituriques différents mis en évidence dans le sang de deux malades . Le troisième est relatif à une intoxication grave par le phénobarbital qui a nécessité deux épurations extra-rénales et où nous avons pu suivre l'évolution du taux du toxique dans le sang .

Premier exemple - MAR...

Rappelons que la technique chromatographique consiste à injecter :

- sur colonne OV 1 l'extrait obtenu à partir du sang surchargé en brallobarbital,
- sur colonne OV 225 le même extrait additionné d'un mélange de 13 barbituriques méthylés . Il est bien

entendu que l'on connaît le profil du chromatogramme de ce dernier mélange (chromatogramme de référence n°10) .

Identification :

- Chromatogramme 13- OV 1 . On constate l'existence :
  . d'un pic C dû à l'ionol,
  . d'un pic dû au brallobarbital, utilisé comme étalon interne,
  . de 4 pics X1, X2, X3, X4 de nature inconnue et situés dans la zone au niveau de laquelle peuvent apparaître des pics dûs aux barbituriques .
  Les indices de rétention relatifs de ces pics par rapport au brallobarbital sont les suivants :

X1	0,48
X2	0,62
X3	0,84
X4	1,82

Si on les rapproche des indices calculés sur un mélange des 13 barbituriques méthylés (tableau IX) , on constate que ces pics peuvent être identifiés aux composés suivants :

. butalbital ou butobalbital
. amobarbital
. secobarbital
. phenobarbital

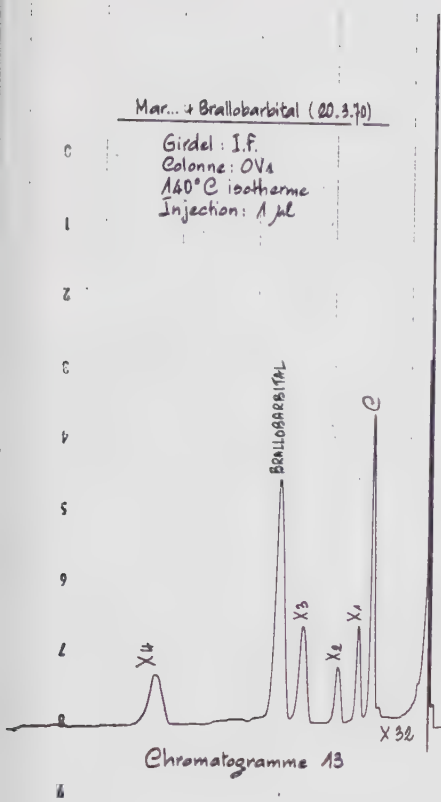
respectivement pour X1, X2, X3, X4 .

L'incertitude concernant l'identification de X1 sera levée, et la confirmation des résultats relatifs à X2, X3 et X4 sera ou non établie par l'examen du chromatogramme obtenu sur OV 225 .

- Chromatogramme 14- OV 225 . Si l'on compare les chromatogrammes 10 et 14 on constate l'augmentation relative de certains pics :

Mar... + Brallobarbital (20.3.70)

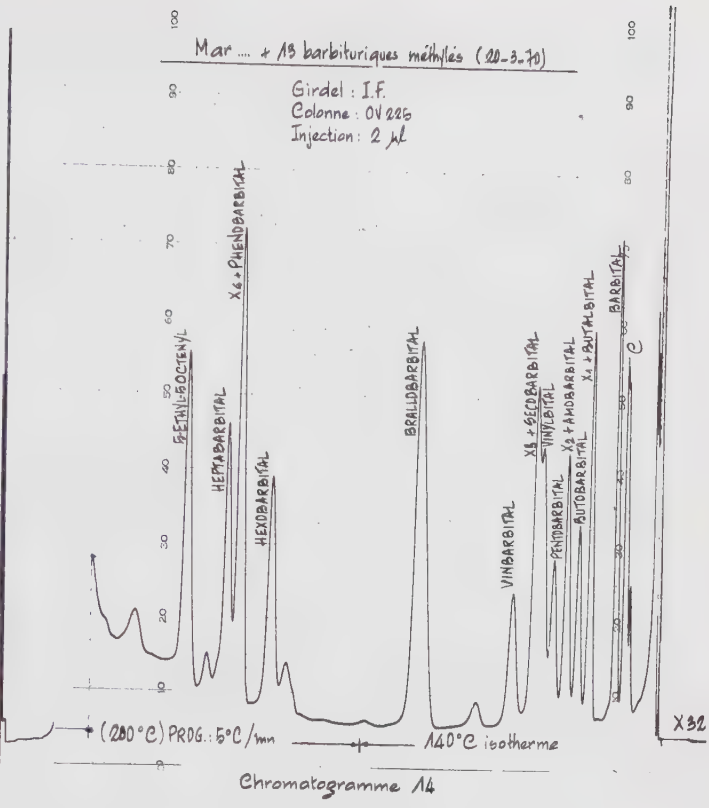
Girdel : I.F.
Colonne : OV1
140°C isotherme
Injection : 1 µl



Chromatogramme 13

Mar .... + 13 barbituriques méthylés (20-3-70)

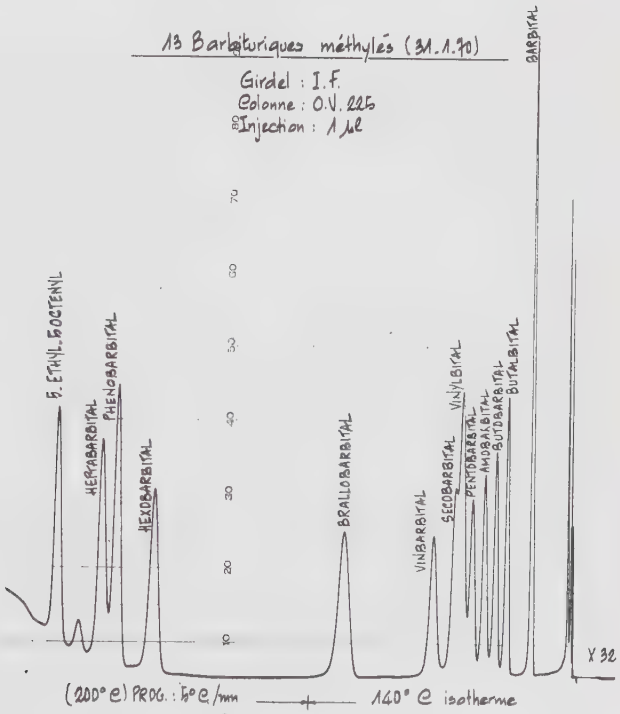
Girdel : I.F.
Colonne : OV 225
Injection : 2 µl



Chromatogramme 14

13 Barbituriques méthylés (31.1.70)

Girdel : I.F.
Colonne : O.V. 225
Injection : 1 µl



Chromatogramme 10

. brallobarbital . Cette augmentation étant due à l'emploi de ce dérivé comme étalon interne .
. butalbital
. amobarbital
. secobarbital
. phenobarbital .

On conclut donc à l'existence dans le sang du malade de ces 4 derniers barbituriques .

Dosage :

Sur le chromatogramme 13 on mesure les hauteurs des différents pics intéressants soit :

. brallobarbital ..... 80 mm
. butalbital ..... 31 mm
. amobarbital ..... 19 mm
. secobarbital ..... 32 mm
. phenobarbital ..... 17 mm

Les concentrations en milligrammes par litre de sang de chaque barbiturique sont obtenues en tenant compte de la valeur des coefficients de poproportionnalité du tableau XIII , de la façon suivante :

. butalbital $25 \cdot \frac{31}{80} \cdot \frac{1}{1,70} = 5,70$ mg/l

. amobarbital $25 \cdot \frac{19}{80} \cdot \frac{1}{1,03} = 5,75$ mg/l

. secobarbital $25 \cdot \frac{32}{80} \cdot \frac{1}{0,66} = 15,10$ mg/l

. phenobarbital $25 \cdot \frac{17}{80} \cdot \frac{1}{0,39} = 13,50$ mg/l

Deuxième exemple : TH...

Pour ce malade deux analyses d'échantillons sanguins ont été pratiquées à trois jours d'intervalle .

- Analyse du 31-1-70 .

La mesure des indices de rétention relatifs sur le chromatogramme 15 :

X1 = 0,50
X2 = 0,60
X3 = 0,85

et la comparaison des chromatogrammes 10 et 16 permet de conclure à la présence de :

. butobarbital
. amobarbital
. secobarbital

aux taux respectifs de : 15,70 - 10,70 - 4,80 mg/l.

Trois jours plus tard, le malade ayant brusquement sombré dans un coma profond, on procéda à une nouvelle recherche des barbituriques .

- Analyse du 3-2-70 .

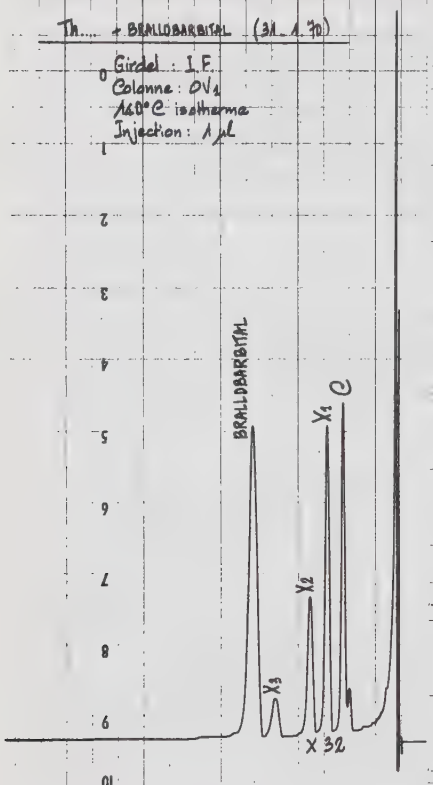
Le chromatogramme 17 obtenu sur OV 1 montre la persistance des 3 pics déjà observés le 31-1-70 (X1 , X2, X3) mais leurs hauteurs comparées à celle du pic du brallobarbital ont nettement diminué . On note surtout l'apparition d'un pic supplémentaire X4 que la mesure de l'indice de rétention relatif (0,70) identifie au pentobarbital ou au vinylbital .

L'examen du chromatogramme n°18 permet de dire qu'il s'agit du pentobarbital .

Il s'agissait d'une erreur thérapeutique ainsi mise en évidence et qui fut sans conséquence pour le malade .

Th.... + BRALLOBARBITAL (31.1.70)

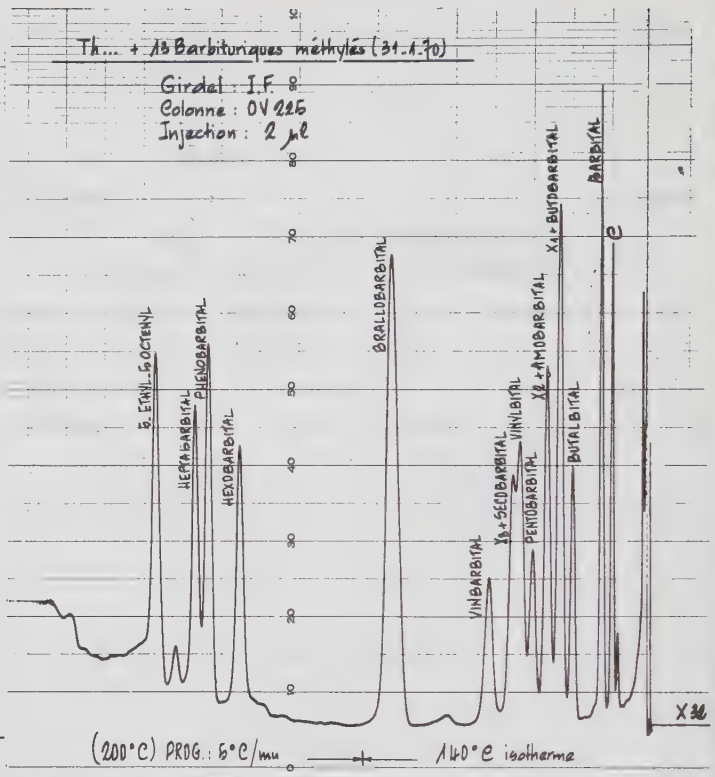
Girdel : I.F.
Colonne : OV_1
140°C isotherme
Injection : 1 µL



Chromatogramme 15

Th.... + 13 Barbituriques méthylés (31.1.70)

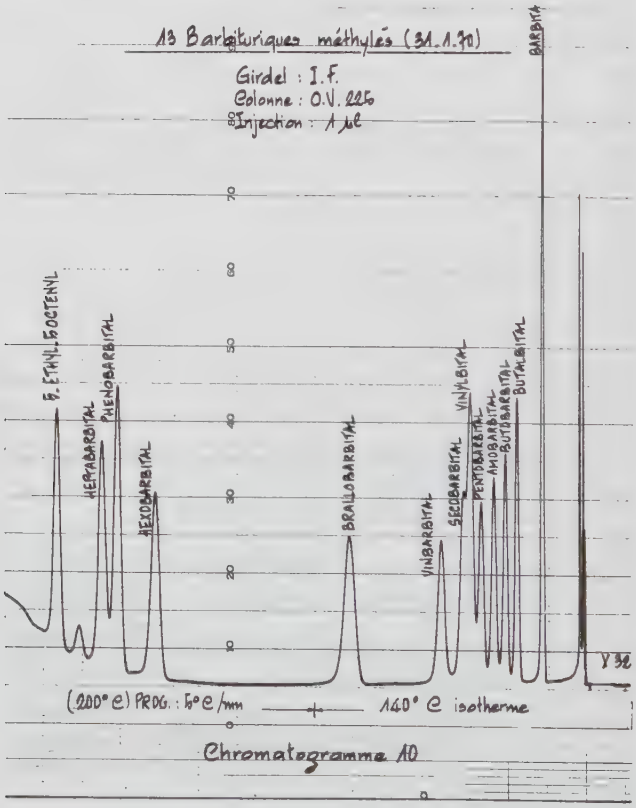
Girdel : I.F.
Colonne : OV 225
Injection : 2 µl



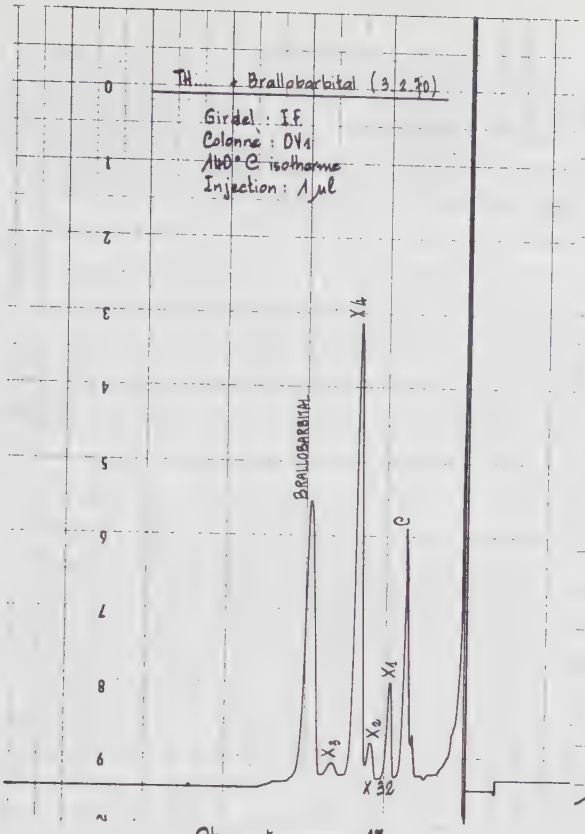
Chromatogramme 16

13 Barbituriques méthylés (31.1.70)

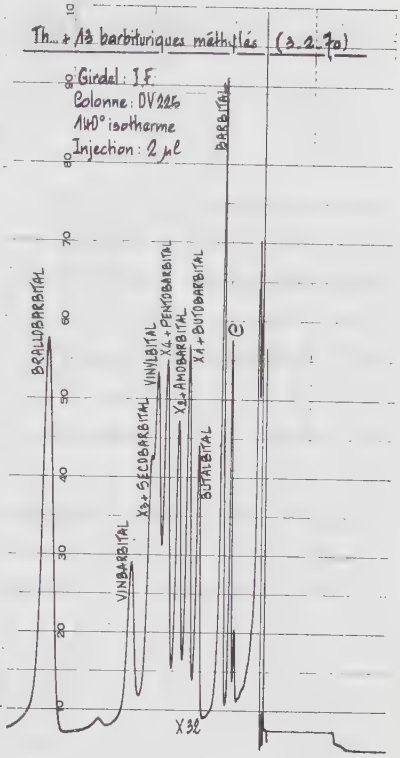
Girdel : I.F.
Colonne : O.V. 225
Injection : 1 µl



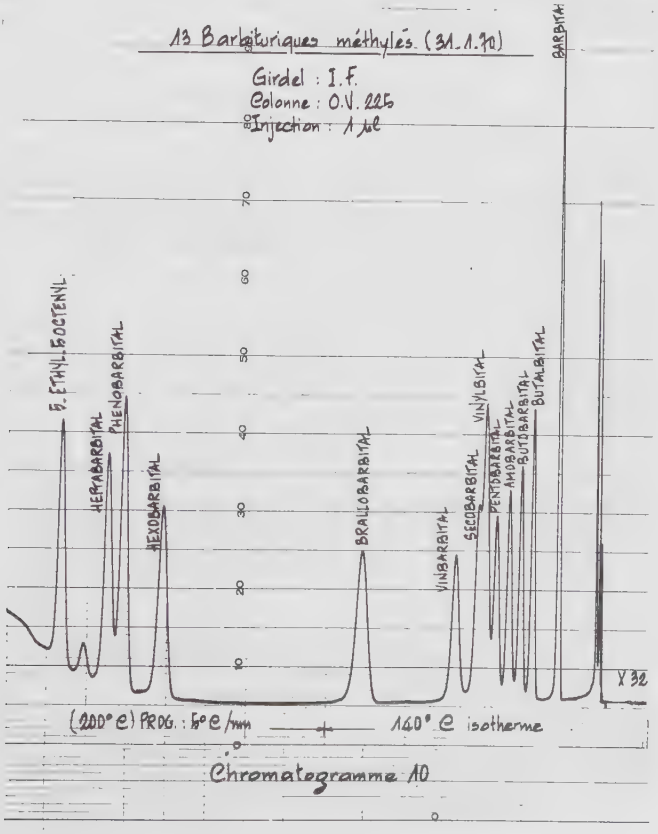
Chromatogramme 10



Chromatogramme 17



Chromatogramme 18



Chromatogramme 10

Troisième exemple : GAT...

Le troisième exemple montre l'intérêt de l'épuration extra-rénale (rein artificiel) dans le traitement des intoxications barbituriques .

Mlle GAT... 21 ans, préparatrice en pharmacie, entre dans le service le 9-2-70 à 18 h 45, après absorption volontaire de produit indéterminé . Elle présente alors un état de somnolence mais demeure réactive. Une première recherche de barbiturique montre la présence de Gardénal et le dosage révèle une concentration de 154 mg/l de sang . Le lendemain à 8h 45, l'état s'est aggravé et la malade est en coma avec abolition de toute réactivité (stade III) . La persistance de ce coma carus malgré la thérapeutique classique instituée (intubation et ventilation artificielle, perfusion, diurèse forcée) amène à envisager une épuration extra-rénale . La malade est mise au rein artificiel une première fois le 13-2-70 .

Trois nouveaux dosages pratiqués à cette occasion montrent que le taux de barbiturique qui était de 177 mg/l au début passe à 126 mg/l après 4 h 30 d'épuration et à 121 mg/l à la fin de cette thérapeutique . Une seconde séance de rein artificiel est pratiquée le 15-2-70 et les nouveaux dosages effectués alors donnent les chiffres suivants :

- au départ de l'épuration extra-rénale 96 mg/l
- après 5 heures ..... 71 mg/l
- à la fin de la séance ..... 64 mg/l

Le jour même la malade se réveille et le 20-2-70 avoue avoir absorbé un paquet de 10 g de gardénal .

Elle quitte le service le 2-3-70 guérie .

Les deux premiers exemples rapportés montrent les possibilités très étendues de la technique utilisée en ce qui concerne la recherche et l'identification des barbituriques . La chromatographie en phase gazeuse nous a permis facilement de faire les diagnostics d'intoxication polybarbiturique .

Quant au dernier cas cité, il illustre parfaitement l'intérêt d'un diagnostic précoce en vue de la mise en œuvre d'une thérapeutique appropriée à la gravité d'une intoxication barbiturique .

CONCLUSIONS GENERALES

Le but de notre travail a été d'utiliser les possibilités offertes par la chromatographie en phase gazeuse pour l'identification et le dosage toxicologique des barbituriques dans le sang .

Nous avons donc tenté de mettre au point une méthode non seulement sensible et sûre, mais encore rapide et relativement simple pour qu'elle soit utilisable en milieu hospitalier et puisse répondre aux impératifs de la clinique . Nous nous sommes tout d'abord efforcé d'adapter les principes de l'analyse toxicologique à cette méthode d'investigation .

Notre expérimentation personnelle a d'abord successivement envisagé l'extraction, la purification et la préparation des échantillons en vue de la chromatographie en phase gazeuse .

Préalablement à l'extraction, parmi les possibilités offertes, il nous a paru plus commode de pratiquer une défécation sulfotungstique . Celle-ci,en effet , élimine les substances à haut poids moléculaire qui, par une élution trop tardive, rendent malaisées des analyses itératives .

D'autre part, il nous a semblé nécessaire de réduire la polarité de la molécule barbiturique, ce qui permet alors d'obtenir des pics plus symétriques et

surtout d'éviter les traînées . La réalisation de ces deux conditions apparaît en effet d'une importance capitale pour prétendre à une identification sûre et à un dosage précis .

Plusieurs possibilités s'offraient à nous pour obtenir cette réduction de polarité . Après essai de substitution par le radical triméthylsilyle au moyen du bis N. O. triméthylsilyl acétamide (B. S. A.) et du groupement méthyle par le diazométhane, l'hydroxyde de triméthylanilinium et le sulfate diméthylique, nous avons conclu à la supériorité de la méthylation par ce dernier agent qui permet des méthylations complètes et reproductibles .

Pour la sûreté d'identification, nous avons été amené à utiliser une colonne polaire et une colonne apolaire . Une étude comparative des phases stationnaires de type SE30, OV 1, Carbowax 20 M, OV 225, XE 60 et OV 17 nous a fait porter notre choix sur l' OV 1 comme phase apolaire et l'OV 225 comme phase polaire .

Enfin, le dosage des barbituriques implique la nécessité d'un étalon interne que nous nous sommes efforcé de définir . Une statistique établie au Centre de Réanimation Respiratoire de Bordeaux, et portant sur 780 cas d'intoxications barbituriques accidentelles ou volontaires nous a montré que parmi les dérivés de la malonylurée, le brallobarbital n'était pratiquement jamais en cause . De plus, cette drogue a l'avantage d'être éluée en position moyenne sur les chromatogrammes du groupe des barbituriques étudiés . Notre choix s'est donc porté sur le brallobarbital comme étalon interne .

Pour illustrer l'intérêt de notre technique, nous avons parmi les 210 recherches toxicologiques de barbituriques pratiquées à ce jour au Laboratoire d'Exploration Fonctionnelle du Centre de Réanimation Respiratoire, choisi trois exemples particulièrement édifiants. Deux montrent la facilité d'identification des produits en cause dans des intoxications polybarbituriques, le troisième permet de suivre l'évolution de la barbitémie au cours du traitement d'une intoxication sévère au Gardénal .

L'ensemble des manipulations nécessitées par notre méthode d'analyse et de dosage demande un délai d'environ 1 h. 30 entre le prélèvement sanguin et la remise des résultats chiffrés .

Quant à la précision des mesures, l'analyse statistique de nos résultats montre une approximation très satisfaisante . Au prix de modifications minimes, cette méthode est applicable à l'identification et au dosage dans d'autres liquides biologiques, en particulier dans l'urine où, couplée avec la spectrométrie de masse, la chromatographie en phase gazeuse devrait nous permettre, sans doute, d'étudier les dérivés métaboliques des barbituriques .

B I B L I O G R A P H I E

---

1. ACKMAN R.G. et BURGHER R.D. -Quantitative gas liquid chromatographie estimation of volatile fatty acids in aquaeous media.
   Anal. Chem. , 1963,35, 647-652.

2. ANDERS M.W. - Rapid micromethod for gas chromatographic determination of blood barbiturates.
   Anal. Chem., 1966, 38, 1945-1947.

3. ANDERS M.W., MANNERING G.J. - Application of gas chromatography to toxicology.
   Prog. Chem. Toxic. , 1967, 3, 121-218.

4. Anonymous. - Barbiturate analysis by gas chromatography in just 3 short minutes.
   Chromatogr. Lipids, 1970, IV, N°2. Supelco. Inc. Bellefonte Pensylvania 16 823.

5. ARNOLD W., GRÜTZMACHER H.F. - Massenspektrometrischer Nachweis von Arzneimittelmetaboliten (Barbiturate, Noludar, Pyramidon) im nahmen der forensischen Analyse.
   Z. Anal. Chem., 1969, 247, 179-188.

6. BALASUBRAMANIAM K., MAWER G.E., RODGERS E.M. - The estimation of amylobarbitone and hydroxyamylobarbitone in serum by gas liquid chromatography
   Brit. J. Pharmacology, 1969, 37, 546-547.

7. BLACKMORE D.J., JENKINS R.W. - Exclusion of urinary barbiturates by gas chromatography.
J. forensic. Sci. Soc., 1968, 8, 34-7.

8. BLOOMER H.A., MADDOCK R.K., SHEEHE J.B., ADAMS E.J. - Rapid diagnosis of sedative intoxication by gas chromatography.
Annals of internal medicine, 1970, 72, 223-228.

9. BOGAN J., SMITH H. - Relation between primidone and phenobarbitone blood levels .
J. Pharm.Pharmac., 1968, 20, 64-67.

10. BOURDON R., FEGER J. et J., KRIKORIAN A., LINEE P. - Recherche et dosage de divers toxiques organiques dans les milieux biologiques.
Ann. Biol. Clin., 1963, 21, 187-218.

11. BRACHET-LIERMAIN A., MICHON D., FERRUS L. - Intérêt de la chromatographie en phase gazeuse dans le diagnostic et le pronostic des intoxications barbituriques.
Bordeaux médical, 1970, 3, 675-688.

12. BRADDOCK L., MAREC N. - The gas chromatography analysis of submicrogram quantities of barbiturate using a flame ionisation detector.
J. Gas chromatog., 1965, 3, 274-277.

13. BROCHMANN-HANSSEN E., SVENDSEN A.B. - Gas chromatography of barbiturates and related compounds
J. Pharm. Sci, 1961, 50, 804.

14. BROCHMANN-HANSSEN E., SVENDSEN A.B. - Separation and identification of barbiturates and some related compounds by means of gas-liquid chromatography.
J. Pharm. Sci., 1962, 51, 318-321.

15. BROCHMANN-HANSSEN E. - Gas chromatography and its application to pharmaceutical analysis .
J. Pharm. Sci., 1962, 51, 1017-1031.

16. BROCHMANN-HANSSEN E. - Gas chromatographic separation and identification of barbiturates. In biomedical application of gas chromatography.
1964, Ed Szymanski, H.A., Plenum Press. N.Y., 182-193.

17. BROCHMANN-HANSSEN E., OLAWUYI OKE T. - Gas chromatography of barbiturates phenolic alkaloïds and xanthine bases : flash-heater methylation by means of trimethylanilinium hydroxide.
J. Pharm. Sci. 1969, 58, 370-371.

18. CASTAGNOU R. - Les barbituriques.
Traité de biologie appliquée - Tome VII - Toxicologie industrielle médicamenteuse et agricole
Ed. Masson 1969, 280-298.

19. CIEPLINSKI E.W. - Prevention of peak tailing in the direct gas chromatographic analysis of barbiturates.
Anal. Chem., 1963, 35, 256-257.

20. CLARKE, E.G.C. - Isolation and identification of drugs
The Pharmaceutical Press., 1969.

21. COOK J.G.H., RILEY C., NUNN R.F., BUDGEN D.E. - Gas chromatography of methyl derivatives of some barbiturates.
J. chromatog. 1961, 6, 182-185.

22. DOUGLAS J.F., SMITH N.B, STOCKAGE J.A.
Gas chromatographic determination of mebutamate carisoprodol and tybamate in plasma and urine.
J. Pharm. Sci. 1969, 58, 145-146.

23. FURANO E.S., GREENE N.M. - Metabolic breakdown of thiopental in man determinated by gas chromatogtaphic analysis of serum barbiturate levels .
Anesthesiology, 1963, 24, 796-800.

24. GROVE J., TOSELAND P.A. - The gas liquid chromatography of hydroxyamylobarbitone in plasma and urine.
Clin. Chim. Acta 1970, 29, 253-260.

25. GUDZINOWICZ B.J., CLARK S.J. - The gas chromatographic analysis of low concentrations of barbiturates using an electron affinity detector.
J. Chromatog., 1965, 3, 147-151.

26. GUDZINOWICZ B.J. - Gas chromatographic analysis of drugs and pesticides.
Chromatographic Sciences Séries 2.
M. Dekker Ny 1967, p. 183.

27. JAIN N.C., FONTAN Ch. R., KIRK P.L. - Rapid extraction method for barbiturates from blood for gas liquid chromatographic analysis.
Microchem. J.1964, 8, 28-34.

28. JAIN N.C., KIRK P.L. - Systematic applications of gas liquid chromatography in toxicology. I Extraction procedure and the alkaloids.
Microchem. J. 1967, 12, 229-241.

29. JAIN N.C., KIRK P.L. - Systematic applications of gas-liquid chromatography in toxicology.III The barbiturates.
Microchem. J. 1967, 12, 249-255.

30. JANAK. - Identification of the structure of non volatile organic substances by chromatography of pyrolytic products.
Nature 1960, 185, 684-686.

31. KAMM J.J., VAN LOON E.J. - Amobarbital metabolism in man a gas chromatographic method for the estimate of hydroxyamobarbital in human
Clin. Chem., 1966, 12, 759-796.

32. KAZYAK L., KNOBLOCK E.C. - Application of gas chromatography to analytical toxicology .
Anal. Chem. 1963, 35, 1442-1452.

33. LEACH H., TOSELAND P.A. - The determination of barbiturates and some related drugs by gas chromatography.
Clin. Chem. Acta 1968, 20, 195-203.

34. LODI F., MAROZZI E. - Applicazioni della gas-chromatografia in tossicologia forense.
Il Farmaco, 1965, 20, 439-457.

35. MACHATA G., BATTISTA H.J. - Gaschromatographische barbituratbestimmung. Praktische Anwendung in der toxikologie.
Mikrochim. Acta 1968, 4, 866-874.

36. MAHER J.F., SCHREINER G.E.- Current status of dialysis of poisons and drugs.
Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs. 1969, 15, 461-477.

37. MARTIN H.F., DRISCOLL J.L. - Gas chromatographic identification and determination of barbiturates.
Anal. Chem. 1966, 38, 345-346.

38. MC MARTIN C., STREET H.V. - Gas-liquid chromatography of submicrogram amounts of drugs. I Préparation, scope, and limitation of columns.
J. chromatog. 1966, 22, 274-285.

39. MC MARTIN C., STREET H.V. - Gas-liquid chromatography of submicrogram amounts of drugs. II Analysis of barbiturates and related drugs in biological media.
J. chromatog. 1966, 23, 232-241.

40. NIYOGI S.K.,CORDOVA V.F., RIEDERS F. - Detection of a secobarbital metabolite in human liver by gas chromatography.
Nature 1965, 206, 716-717.

41. PARKER K.D., KIRK P.L. - Separation and identification of barbiturates, by gas chromatography.
Anal. Chem., 1961, 33, 1378-1381.

42. PARKER K.D., FONTAN Ch. R., KIRK P.L. - Rapid gas chromatographic method for screening of toxicological extracts for alkaloïds, barbiturates, sympathomimetic amines and tranquilizers.
Anal. Chem., 1963, 35, 356-359.

43. PARKER K.D., FONTAN Ch.R., KIRK P.L. - Improved gas chromatographic column for barbiturates.
Anal. Chem. 1963, 35, 418-419.

44. PARKER K.D., WRIGHT J.A., HALPERN A.F., HINE C.H. - The determination of barbiturates in blood and urine gy gas liquid chromatography with a peak shift for qualitative confirmation.
J. Forensic Sci., 1967, 125-140.

45. PIERCE A.E. - Silylation of organic compounds
Pierce Chemical Company Rockford Illinois.

46. REITH J.F., VAN DER HEIDE R.F. ZWALL R.F.A.- Herkenning en bepaling van barbitalen in bloed, door middel van gas chromatografie.
Pharm. Weekblad, 1965, 100, 219-227.

47. SCHNEIDER D. - Le dosage et l'identification des barbituriques au cours d'intoxications aiguës, thérapeutiques et expérimentales.
Thèse Strasbourg, 1966, N°842.

48. STEVENSON G.W. - On column methylation of barbituric acids.
Anal. Chem., 1966, 38, 1948-1949.

49. STREET H., MAC MARTIN C. - Quantitative estimation and identification of barbiturates in blood and emergency cases.
Nature 1963, 199, 456-461.

50. STREET H.V. - Gas liquid chromatography of submicrogram amounts of drugs. III Analysis of alkaloïds in biological media.
J. Chromatog., 1967, 29, 68-79.

51. STREET H.V. - Forensic problems in the gas chromatography of amines and alkaloids.
J. chromatog., 1968, 37, 162-171.

52. STREET H.V. - Gas liquid chromatography of submicrogram amounts of drugs.
IV. Identification of barbiturates, hydantoïns, Amides, imides, carbamates, phenylbutazone, carboxylic acids and hydrazine derivatives by direct derivative formation within the gas chromatography.
J. Chromatog., 1969, 41, 358-366.

53. STUCKEY R.E. - The ultra-violet absorption spectra of barbituric acid derivatives. Part. III Barbitone and phenobarbitone and their methyl derivatives.
Quart. J. Pharm. Pharmacol., 1941, 14, 217-225.

54. SUNSHINE I., FINKLE B. - The gas chromatographic analysis of biological materials for CNS depressants.
Clin. Chem., 1964, 10, 648.

55. SUNSHINE I., MAES R., FINKLE B. - An evaluation of methods for the determination of barbiturates in biological materials.
Clin. Toxicology, 1968, 3, 281-296.

56. SVENDSEN A.B., BROCHMANN-HANSSEN E.- Gas chromatography of barbiturates. II Application to the study of their metabolism and excretion in humans. J. Pharm. Sci., 1962, 51, 494-495.

57. THOMPSON H.L., DECKER W.J. - A simplified gas chromatography approach for toxicology purposes. Amer. J. clin. Path., 1968, 49, 103-107.

58. TRANCHANT J. - Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Deuxième édition, 1968, Ed. Masson.

59. VANDENHEUVEL W.J.A., HAAHTI E.O.A., HORNING E.C.- Gas chromatographic separations of drugs and drug metabolites. Clin. Chem., 1962, 8, 351-359.

60. VAN METER J.C., BUCKMASTER H.S., SHELLEY L.L. - Concurrent assay of phenobarbital and diphenylhydantoin in plasma by vapor-phase chromatography. Clin. Chem., 1970, 16, 135-138.

61. WELTON B. - Analyses of nanogram levels of barbiturates. Chromatographia 1970, 3, 211-216.

--°--

Editions BERGERET-2, rue Bergeret-BORDEAUX, Tel. 91.12.59.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE - L'analyse des barbituriques - Principes généraux et Méthodes	7
Chapitre I - Principes généraux d'identification et de dosage des barbituriques dans les liquides biologiques	9
Chapitre II - Application de la chromatographie en phase gazeuse à l'identification et au dosage des barbituriques	15
Chapitre III - La chromatographie en phase gazeuse - Principes - Généralités	39
Chapitre IV - La spectrométrie de masse - Principes généraux	57
DEUXIEME PARTIE - Recherches personnelles	65
Chapitre I - Préparation de l'échantillon à chromatographier	67
Chapitre II - Séparation et identification des barbituriques	81
Chapitre III - Dosage des barbituriques	99
Chapitre IV - Réalisation pratique de l'identification et du dosage d'un barbiturique dans le sang	117